



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS**

BRENDA OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DA
FOLHA DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER SOBRE
Streptococcus mutans UA159**

Vitória da Conquista, BA

2020

BRENDA OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DA
FOLHA DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER SOBRE
Streptococcus mutans UA159**

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

2020

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

L732

Lima, Brenda Oliveira.

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações e subfrações da folha de *Schinopsis brasiliensis* Engler sobre *Streptococcus mutans* UA159. / Brenda Oliveira Lima. - 2020
80 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regiane Yatsuda

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Mariluze Peixoto Cruz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2020.

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

CDU: 615

BRENDA OLIVEIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES DA
FOLHA DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER SOBRE
Streptococcus mutans UA159**

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

Prof. Dr. Regiane Yatsuda (Orientadora)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Examinador)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos (Examinador)

Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre me iluminando, abençoando e guiando os meus passos.

Aos meus pais, José Carlos e Luciene, e a meu irmão, Bruno, por todo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu noivo, Filipe, pelo carinho, incentivo, compreensão e cumplicidade. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

À minha orientadora, Regiane Yatsuda, a quem sou grata pelas oportunidades, orientação, confiança e por acompanhar toda a minha trajetória na UFBA. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e paciência.

À minha co-orientadora, Mariluze Cruz, pelos ensinamentos, incentivo e estando sempre à disposição para ajudar em diversos momentos.

Aos docentes da UFBA pelo conhecimento partilhado, e a banca avaliadora (Lucas e Guilherme) por disponibilizarem seu tempo.

À Rafael Almeida, Manuela, Jeisa e Nayara, por toda a amizade, aprendizado compartilhado e palavras de incentivo e otimismo.

Ao grupo Mutans, Louise, Iago, Paulo, Isabella, Luccas, Caio, Vanessa e Vitor, pelo comprometimento, empenho, amizade e por terem me ajudado neste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação, Lorena, Talita, Ana, Thiago e Rafael Dórea pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

A Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

LIMA, BRENDÁ OLIVEIRA. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações e subfrações da folha de *Schinopsis brasiliensis* Engler sobre *Streptococcus mutans* UA159.** 2020. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2020.

A cárie é uma doença oral multifatorial e infecciosa que afeta a maioria da população mundial ao longo da vida. *Streptococcus mutans* é um dos principais agentes etiológicos para a formação do biofilme dental devido a sua capacidade de adesão, acidogenicidade e aciduricidade, que são os principais fatores associados à cariogenicidade. As plantas medicinais podem ser uma alternativa para obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem o controle de biofilmes microbianos. Neste contexto, a *Schinopsis brasiliensis* Engler conhecida popularmente como Braúna, tem sido bem apreciada localmente na medicina popular, devido a existência de compostos químicos que possuem atividade biológica, principalmente antimicrobiana. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A), butanol e subfrações (H, D e A) das folhas de *S. brasiliensis* contra *S. mutans* UA159. Para isso, foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (MBC) e concentração inibitória mínima de adesão (CIMA). A atividade do extrato etanólico (2 g/mL) foi avaliada em relação à inibição da formação de biofilme, seus efeitos sobre a glicólise e a permeabilidade da membrana à prótons, e análise da formação dos polissacarídeos. Os menores valores de CIM (31,25 µg/mL) foram obtidos com o extrato etanólico, diclorometano, subfrações H3 e D4. A fração butanol e a D4.11 não apresentaram CIM na concentração máxima testada. Em relação à CBM, foi demonstrada atividade bactericida no extrato etanólico, hexano, diclorometano, acetato de etila, subfrações H2, D2, D3, D4, D4.8, A1 e A2. Butanol, subfrações H1, H3, H4, D4.11, D4.12, D4.13 A3 e A4 não demonstraram CBM na máxima concentração testada de 1000 µg/mL. Nas análises da formação dos biofilmes, o tratamento com o extrato etanólico reduziu a biomassa, glucanos insolúveis e solúvel em álcali em comparação com o biofilme do controle ($p < 0,05$). O extrato etanólico afetou a produção de ácido do biofilme ($p < 0,05$), e também alterou a tolerância ácida das células de *S. mutans* UA159 em biofilmes. Os principais compostos bioativos encontrados na fração diclorometano

foram timol, galato de etila, ácido gálico e galato de metila. Este é o primeiro relato de atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *S. brasiliensis* contra o biofilme de *Streptococcus mutans*. Assim, o extrato etanólico, frações e subfrações das folhas de *S. brasiliensis* demonstraram potencial terapêutico para o uso na prevenção da formação da cárie dental, pois apresentou atividade antimicrobiana e inibiu importantes fatores de virulência de *S. mutans* UA159. Mais estudos serão realizados no futuro para elucidar os compostos antimicrobianos nas outras frações do extrato etanólico e para elucidar os mecanismos de ação desses compostos contra *S. mutans*.

Palavras-chave: Cárie, *Streptococcus mutans*; plantas medicinais; *Schinopsis brasiliensis* Engler; antimicrobiano; biofilme, acidogênico; acidúrico.

ABSTRACT

LIMA, BRENDA OLIVEIRA. **Antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions and subfractions from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler against *Streptococcus mutans* UA159** 2020. Master's Dissertation – Multidisciplinary Institute of Health, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2020.

Caries is a multifactorial and infectious oral disease that affects the majority of the world's population. *Streptococcus mutans* is one of the main etiologic agents for the formation of dental biofilm due to its adhesion, acidogenicity and acidity, which are the main factors associated with caryogenesis. Medicinal plants can be an alternative to antimicrobial agents that allow the control of microbial biofilms. In this context, an *Schinopsis brasiliensis* Engler, popularly known Braúna in Brazil, has been much appreciated locally in popular medicine, due to the presence of chemical compounds that have biological activity, mainly antimicrobial. Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions hexane (H), dichloromethane (D), ethyl acetate (A), butanol and subfractions (H, D and A) of the leaves of *S. brasiliensis* against *S. mutans* UA159. For this, the tests of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum inhibitory concentration of adhesion (MICA) were performed. The activity of the ethanolic extract was evaluated in relation to inhibition of biofilm formation, its effects on glycolysis and membrane permeability to protons, and analysis of polysaccharide formation. The lowest MIC values were obtained with the ethanolic extract, dichloromethane, H3 and D4 subfractions at 31.25 µg/mL. Butanol and D4.11 did not show MIC at the maximum concentration tested. In relation to MBC, bactericidal activity was demonstrated in the ethanolic extract, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, H2, D2, D3, D4, D4.8 A1 and A2. Butanol, H1, H3, H4, D4.11, D4.12, D4.13 A3 and A4 did not show MBC at the maximum concentration tested at 1000 µg/mL. The extracts tested with sub-MIC concentrations did not inhibit adherence of *S. mutans* UA159. In biofilm analyzes, treatment with the ethanol extract of *S. brasiliensis* (2 g/mL) in the tested concentration was able to reduce biomass, insoluble and alkaline soluble glucans compared to the control biofilm ($p < 0.05$). The ethanolic extract affected the acid production of the biofilm ($p < 0.05$), and also altered the acid tolerance of *S.*

mutans UA159 cells in biofilms. The main bioactive compounds found in the dichloromethane fraction were thymol, ethyl gallate, gallic acid and methyl gallate. This is the first report of antimicrobial activity of ethanolic extract from *S. brasiliensis* against *Streptococcus mutans* biofilm. Thus, the ethanolic extract, fractions and subfractions of the leaves of *S. brasiliensis* demonstrated therapeutic potential for use in preventing the formation of dental caries, as it presented antimicrobial activity and inhibited important virulence factors of *S. mutans* UA159. More studies will be conducted in the future to elucidate the antimicrobial compounds in the other fractions of the ethanolic extract, and to elucidate the mechanisms of action of these compounds against *S. mutans*.

Keywords: Caries; *Streptococcus mutans*; medicinal plants; Antimicrobial; *Schinopsis brasiliensis* Engler; biofilm, aciduric, acidogenic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Fotos de <i>S. brasiliensis</i> Engler.....	22
FIGURA 2- Fluxograma do fracionamento bioguiado dos extratos das folhas de <i>S. brasiliensis</i>	27
FIGURA 3- Sequência da confecção dos corpos de prova.....	31
FIGURA 4- Representação das fases do ensaio de formação, <i>in vitro</i> , do biofilme por <i>S. mutans</i>	32
FIGURA 5- Fluxograma de trabalho para ensaio de biofilme.....	33
FIGURE 1- Flowchart of fractionation of the extracts of <i>S. brasiliensis</i> leaves.....	63
TABLE 1- Thin Layer Chromatography with phytochemical profiles to assess the presence of flavonoids, alkaloids and steroids of Ethanolic extract, fraction, subfractions of the leaves of <i>Schinopsis brasiliensis</i>	64
TABLE 2- Chemical constituents identified in subfractions D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12, D4.13 from the leaves of <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler.....	65
TABLE 3. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the Ethanolic extract, fractions and subfractions of the leaves of <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler against <i>Streptococcus mutans</i> UA159....	67
TABLE 4- Effects of ethanolic extract of the leaves of <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler on viability of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in biofilms.....	68
TABLE 5- Effects of the ethanolic extract of the leaves of <i>Schinopsis brasiliensis</i> on the composition of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in biofilms.....	69
FIGURE 2- Influence of ethanolic extract the <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler leaves on glycolytic pH-drop in <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in biofilms.....	70
FIGURE 3- Influence of ethanolic extract from leaves of <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler on proton permeability's of <i>Streptococcus mutans</i> UA159 in biofilms.....	71

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

°C:	Grau Celsius
µg:	Micrograma
µL:	Microlitro
ANOVA:	Análise de variância
BA:	Bahia
BuOH:	Butanol
Caldo BHI:	Meio brain heart infusion para cultivo de estreptococos
CBM:	Concentração bactericida mínima
CCD:	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM:	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CH₂Cl₂	Diclorometano
CIM:	Concentração inibitória mínima
CIMA:	Concentração inibitória mínima da aderência
CO₂:	Dióxido de carbono
DMSO:	Dimetilsulfoxido
EtOAc:	Acetato de etila
FCA:	Ferrovia Centro Atlântica
FLONA:	Floresta Nacional Contendas do Sincorá
GtfB:	Glucosiltransferases B
GtfC:	Glucosiltransferases C
GtfD	Glucosiltransferases D
H₂O:	Água
HCl:	Ácido clorídrico
HEX:	Hexano
HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência
KCl:	Cloreto de potássio
KOH:	Hidróxido de potássio

Log:	Logarítmica
MeOH:	Metanol
mg:	Miligrama
mm:	Milímetro
mM:	Milimolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEC:	Polissacarídeos extracelulares
pH:	Potencial hidrogeniônico
PIC:	Polissacarídeos intracelulares
rpm:	Rotações por minuto
RMN	Ressonância magnética nuclear
UFC:	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Microbiota oral e <i>Streptococcus mutans</i>	15
2.2. Cárie.....	17
2.2. Plantas medicinais.....	19
2.3 <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	21
3. OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Coleta do material vegetal.....	24
4.2 Preparo do extrato etanólico.....	24
4.3 Preparo das frações.....	25
4.4 Preparo das subfrações.....	25
4.5 Estudo fitoquímico preliminar do extrato com reações de caracterização dos metabólitos.....	28
4.6 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).	28
4.7 Microrganismo e cultivo.....	29
4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
4.9 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	30
4.10 Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)	30
4.11 Confecção dos discos para realização do biofilme.....	31
4.12 Ensaio de Biofilme.....	31
4.12.1 Preparo do inóculo e incubação do <i>S. mutans</i>	31
4.12.2 Biomassa (peso seco)	33
4.12.3 Viabilidade bacteriana (Contagem de UFC)	33
4.12.4 Quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis em álcali) ...	34
4.12.5 Queda de pH (via glicolítica)	34
4.12.6 Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons	34
4.13 ANÁLISES ESTATISTICAS.....	35
CAPÍTULO 1	43
ANEXO A.....	77
ANEXO B.....	78

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença oral infecciosa persistente que afeta a maioria da população mundial ao longo da vida, sendo a causa mais comum de dor na cavidade oral e perda dentária (KASSEBAUM et al., 2017; PITTS; ZERO, 2012; LOSSO et al., 2009). Os custos diretos com tratamento das doenças bucais em todo o mundo, representa cerca de 4,6% dos gastos globais, sendo considerada um desafio de saúde pública e em muitos países é concedida pouca prioridade pelas organizações (LISTL et al., 2015).

O desenvolvimento da cárie depende da interação de alguns fatores que vão modificar a homeostase gerando um desequilíbrio no ambiente bucal, como o hospedeiro, alterações no sistema imune, pH, fluxo salivar, fatores genéticos, ineficiência na higienização bucal e os hábitos alimentares com elevado consumo de carboidratos fermentáveis, gerando um ambiente propício para infecção bacteriana (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007; BARBIERI et al., 2014). *Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico responsável para o início e progressão da cárie em humanos (HAMADA; SLADE, 1980). Sendo uma bactéria cariogênica, tem a capacidade de produzir ácidos orgânicos, através da fermentação de açúcares da dieta, que resulta na redução do pH no biofilme, levando a dissolução do esmalte dental (CHEN et al., 2019). Além da produção de ácidos, conseguem sobreviver em baixo pH, e sintetizar glucanos extracelulares solúveis e insolúveis a partir da sacarose pela ação da enzima glicosiltransferases (GTFs), que são fatores importantes na patogênese desta infecção bucal (SELWITZ et al., 2007; BARBIERI et al., 2014).

Atualmente, agentes antimicrobianos como a clorexidina são amplamente usados na prevenção e tratamento da cárie, porém com uso prolongado pode causar efeitos colaterais indesejados como manchas nos dentes, irritação gastrointestinal, queimaduras no tecido mole, perdas gustativas e gosto desagradável na boca (PAGORARO et al., 2015; FRANCISCO, 2010). Portanto, terapias alternativas para obtenção de agentes antimicrobianos, têm sido investigados a partir de compostos e extratos vegetais para o controle do biofilme dental com maior atividade terapêutica, biocompatibilidade, baixa toxicidade e custo mais acessíveis à população (FRANCISCO, 2010; PALOMBO, 2011; CASTILHO; MURATA; PARDI, 2006).

Os conhecimentos advindos dos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado uma fonte de saber para o uso das plantas com fins terapêuticos ao longo dos anos, o que trouxe diversas contribuições para pesquisas com plantas medicinais (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Além disso, o território brasileiro abrange a maior diversidade biológica do mundo, e tem se mostrado fonte promissora para a descoberta de medicamentos de origem vegetal, sendo importante alternativa em consequência do aumento da resistência bacteriana, atribuído ao uso indevido de antibióticos que são comumente usados para tratar infecções (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018; MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014).

Neste contexto, *Schinopsis brasiliensis* Engl. pertence à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como braúna, e é nativa do Nordeste do Brasil (CARVALHO, 2009; CHAVES et al., 2011). Suas folhas, casca e frutos são usados para gripe, tosse, febre, fraturas e como antimicrobiano (ALBUQUERQUE, 2006; ALMEIDA et al., 2005). Além disso, estudos com *S. brasiliensis* revelaram a presença de compostos químicos que possuem atividade biológica, principalmente antimicrobianas, tais como: taninos, fenóis, flavonoides e alcaloides (CARDOSO et al., 2005; CHAVES et al., 2011).

Portanto, devido aos crescentes estudos com plantas medicinais ao longo dos anos e à necessidade do descobrimento de novos agentes antimicrobianos para combater o desenvolvimento da cárie, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações e subfrações das folhas de *S. brasiliensis* contra *S. mutans* UA159.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota oral e *Streptococcus mutans*

Diversos microrganismos estão presentes na cavidade oral humana, como as bactérias, fungos, vírus, archaea e os protozoários (WADE, 2013; ZHANG et al., 2018). Foram identificadas mais de 700 espécies microbianas, sendo a segunda maior e mais diversa microbiota, depois do trato gastrointestinal (VERMA; GARG; DUBEY, 2018). Na boca, cerca de 96% das bactérias orais foram classificadas em seis principais filos como, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* e *Fusobacteria*. Entre os *Firmicutes*, *Streptococcus* é o gênero mais abundante com cerca de 19,2% (VERMA; GARG; DUBEY, 2018).

A cavidade bucal é um ambiente dinâmico, quente, úmido, rico em nutrientes e composto por microambientes distintos como os dentes, sulco gengival, gengiva, língua, bochechas, palato duro e mole, fornecendo um local propício para formação de biofilme dental (DEWHIRST et al., 2010). A saliva, desempenha um papel importante para manter a homeostase oral, através do seu papel como tampão salivar, que dilui e neutraliza os ácidos (PEDERSEN; BELSTRØM, 2019). No entanto, diversos fatores podem perturbar o equilíbrio, como taxa do fluxo salivar, hábitos alimentares e a falta de higiene bucal (ZAURA et al., 2014; KILIAN, 2018). Essa disbiose leva a alterações no pH, por produzir ácidos orgânicos a partir da fermentação de carboidratos, favorecendo as espécies acidúricas e acidogênicas no biofilme em relação as bactérias comensais (ABRANCHES et al., 2018).

O biofilme dental é polimicrobiano, constituído por muitos microrganismos que produzem ácido, principalmente espécies do grupo Mutans, como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, devido o interesse clínico são as mais estudadas. No entanto, outras espécies microbianas também foram isoladas de lesões cariosas como, *Lactobacillus* e *Bifidobacterias* (MARSH, 2006; GROSS et al., 2012).

Streptococcus mutans pertencente 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). Geralmente, os três principais fatores associados ao potencial cariogênico incluem, a adesão, acidogenicidade

(capacidade de produzir ácido) e aciduricidade (capacidade de sobreviver em meio ácido) (LEMOS; BURNE, 2008).

A capacidade de *S. mutans* em aderir firmemente à superfície do dente, por ação de três tipos de glicosiltransferases (GTFs) como GTB, GTFC e GTFD que metabolizam sacarose em glucanos (BOWEN; KOO, 2011; BANAS; VICKEMAN, 2003). 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).

Além de sintetizar polissacarídeos extracelulares (PEC), 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 fermentação de carboidratos realizado por *S. mutans*, leva a produção de ácidos orgânicos como ácido lático, e os baixos valores de pH no biofilme contribuem para a desmineralização do esmalte dental (MATSUI; CVITKOVITCH, 2011). Além disso, o microrganismo consegue sobreviver em baixo pH (aciduricidade), por desenvolver mecanismos para aliviar a influência da acidificação (LEMOS; BURNE, 2008). Esta capacidade é atribuída à atividade da F₁ -F₀-ATPase, por extrusão de prótons, permitindo a manutenção de um pH citoplasmático mais alcalino em comparação com o ambiente extracelular, mantendo a homeostase celular e a produção de energia para o seu metabolismo em condições extremas de pH baixo (LEMOS; BURNE, 2008; STURR; MARQUIS, 1992; SHENG; MARQUIS, 2006; SEKIYA et al., 2019).

Durante a formação do biofilme dental, ocorre a liberação de proteínas antimicrobianas, denominadas de bacteriocinas (mutacinas) que são sintetizadas por *S. mutans*, embora não sejam necessárias para o crescimento, interferem na invasão e

proliferação de outras bactérias no biofilme, conferindo uma vantagem ecológica, favorecendo o seu potencial cariogênico (SOTO; PADILLA; LOBOS, 2017; KAMIYA; HOFLING; GONÇALVES, 2008; MATSUMOTO-NAKANO, 2018).

2.2 Cárie

A Cárie é uma doença crônica, sendo mais comum na infância e em pessoas suscetíveis ao longo da vida, cuja etiologia é complexa e multifatorial (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). São considerados uma variedade de fatores etiológicos para o estabelecimento desta infecção bucal, como fluxo e composição salivar, fatores genéticos, componentes imunológicos, hábitos alimentares com dieta rica em carboidratos fermentáveis, especialmente a sacarose, bem como a estrutura social, comportamentais e alta contagem de bactérias cariogênicas (LIMA, 2007; BARBIERI et al., 2014).

A cárie em dentes decíduos, afeta globalmente cerca de 621 milhões de crianças, com uma maior prevalência em grupos socialmente desfavorecidos e minoritários com vulnerabilidade social (KASSEBAUM et al., 2015; KAWASHITA, KITAMURA; SAITO, 2011). 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). As lesões cariosas se não tratadas, afeta a qualidade de vida desses indivíduos ocasionando desconforto e dor ao comer, o que pode levar a desnutrição e distúrbios do sono, abscessos dentários e até a perda da estrutura dentária (SEOW, 2018). Além disso, o contato precoce com a doença na infância, pode influenciar diretamente a saúde bucal na vida adulta, devido a colonização das bactérias cariogênicas na cavidade oral e danos irreversíveis ao tecido dentário e até mesmo perda dentária (GROSS et., 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) evidências demonstram que o consumo de açúcares livres superior a 10% da ingestão total de energia aumenta as taxas de cárie. Assim, em 2015 uma nova diretriz recomenda que crianças e adultos reduzam a ingestão diária para menos de 10% ou até mesmo abaixo de 5 % da dieta para reduzir o risco de cárie. Esses açúcares livres são monossacarídeos e dissacarídeos que são adicionados a alimentos e bebidas pelo fabricante, cozinheiro ou consumidor, e os

que são naturalmente presentes no mel, xaropes, sucos e concentrados de frutas (OMS, 2015).

Os processos físicos e químicos de desmineralização e remineralização ocorrem frequentemente na maioria das pessoas ao longo do dia (STRUŽYCKA, 2014). 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; STRUŽYCKA, 2014). 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 da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$) (GUTIÉRREZ-SALAZAR; REYES-GASGA, 2003). Quanto maior o período em que o alimento contendo carboidrato ficar retido na boca, por mais tempo haverá substrato para a formação de ácido (PITTS; ZERO, 2012).

Se o desequilíbrio “des-re” prolongar, e a perda de mineral for suficiente nos estágios iniciais, a lesão é clinicamente visível na superfície do dente como manchas brancas, muitas vezes nesse caso pode ser reversível ou interrompida com o uso do flúor (LIMA, 2007; FONTANA, GONZALEZ-CABEZAS, 2018). Se a fase de desmineralização prolongar, uma lesão irreversível da cárie, poderá progredir e atingir a polpa dentária e será necessário um tratamento de canal radicular ou até mesmo a extração dentária (PITTS; ZERO, 2012). A perda dentária, pode afetar a qualidade de vida em muitas situações na fonética, estética, autoestima e impactos psicossocial para esses indivíduos (CHEN; YU; ZHU, 2012).

O tratamento dentário é oneroso e a prevenção ainda continua sendo a base dos cuidados da saúde bucal é de fundamental importância, já que a cárie pode ser reversível (HENSHAW; GARCIA; WEINTRAUB, 2018; NGABAZA; MOENO; PATEL, 2018). Diversos fatores podem auxiliar para promoção de saúde bucal, como mudanças no estilo de vida, redução do consumo de alimentos cariogênicos, a prática de higienização bucal adequada com o uso de fio dental, enxaguantes bucais e aplicação de vernizes de fluoreto aos dentes (JAUHARI et al., 2015; FONTANA, GONZALEZ-CABEZAS, 2018; WONG; SUBAR; YOUNG, 2017).

2.3 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais no Brasil no tratamento de patologia é oriunda de uma mistura de influências da cultura indígena brasileira, africana e europeia na colonização (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). Partes das plantas como folha, casca, raiz, semente, fruto e flores são usadas de diferentes formas na medicina popular, desde a preparações dos chás, infusões, banhos e tinturas para fins terapêuticos (MUSSI-DIAS et al., 2012; PAREKH; KARATHIA; CHANDA, 2006; CASTILHO et al., 2006). Contudo, muitas vezes essas plantas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Além disso, frequentemente à população tem a percepção que o uso de produtos naturais é inteiramente seguro no tratamento de doenças por ser “natural”, no entanto, se não utilizadas de forma correta, podem desencadear reações adversas pelos próprios constituintes, ocasionando graves acidentes por intoxicação (BALBINO; DIAS, 2010; CAMPOS et al., 2016; JUNIOR, 2008). Desta forma, a investigação científica referente à correta identificação botânica, forma de cultivo, eficácia das plantas medicinais, são de suma importância, pois a toxicidade da maioria ainda é parcialmente desconhecida (BALBINO; DIAS, 2010; CAMPOS et al., 2016).

O Brasil é o país com a maior diversidade biológica do planeta, possui mais de 45.000 espécies de plantas conhecidas, cerca de 20% do número total do mundo (RIBEIRO et al., 2018; BOLZANI et al., 2012). Porém, parte desta biodiversidade ainda não foi investigada quanto o seu perfil químico e biológico (HICKL et al., 2018). Além disso, a comercialização de produtos inovadores a partir dos compostos bioativos provenientes da biodiversidade brasileira são escassos (CALIXTO, 2019).

A descoberta de fármacos a partir de produtos naturais encontra-se estabelecido há séculos, aproximadamente cerca de 25% dos produtos farmacêuticos convencionais foram originados a partir das plantas (CALIXTO, 2019). A perspectiva em investigar novas substâncias com potencial terapêutico é uma tendência, por serem mais eficazes, com menor potencial tóxico e por apresentarem efeitos terapêuticos parecidos com os fármacos sintéticos, o que atrai a indústria farmacêutica na possibilidade em desenvolver novas substâncias químicas a partir de fontes naturais (VALLI; RUSSO; BOLSONI, 2018; VALLI; BOLZANI, 2019).

As plantas são ricas em uma variedade de compostos químicos. Muitos são metabólitos secundários e são classificados de acordo com estruturas químicas como, alcaloides, cumarinas, flavonoides, fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, taninos e terpenoides, e muitos desses metabólitos demonstraram ter efeitos biológicos, fornecendo a base científica para o uso na medicina tradicional (HICKL et al., 2018; PALOMBO, 2011). Diversos fatores podem interferir na quantidade do composto químico vegetal, como a localização geográfica, períodos do ano e dia da coleta, clima, temperatura, umidade, tipos de solos, nutrientes, radiação UV e a forma de uso *in natura* ou desidratada (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários das plantas, podem ser extraídos usando diferentes solventes, como água, etanol, metanol, acetona entre outros (JEON et al., 2011). O extrato bruto é obtido com complexidade de compostos e com isso, uma etapa subsequente é o fracionamento pois, permite a separação inicial de diversos compostos e uma posterior identificação da fração mais biologicamente ativa. Para isto, podem ser utilizados métodos baseados na polaridade como por exemplo, cromatografia em coluna seca (sílica gel) ou líquida (Sephadex LH-20) (JEON et al., 2011). Para identificação e quantificação dos compostos bioativos, diversas técnicas têm sido empregadas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras (BERLINCK et al., 2017; ZOLLNER; SCHWARZ, 2013; JEON et al., 2011).

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 uso indiscriminado de antibióticos favoreceu o advento da resistência e a diminuição da suscetibilidade dos microrganismos, gerando esse grave problema global de saúde pública e com isso resultou em uma crescente busca ao potencial farmacológico das espécies vegetais brasileiras. Assim, os pesquisadores vêm realizando estudos para buscar a validação científica ao conhecimento empírico passado de geração em geração (ASLAM et al., 2018; KARYGIANNI et al., 2016).

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). Métodos tradicionais para prevenção da cárie podem ser refratário à medidas preventivas comuns por remoção mecânica, como a escovação, uma vez que o biofilme dental se torna mais rígido. Além disso, muitas vezes as pessoas não possuem conhecimento, habilidades e motivação o que limita o seu uso (GROSS e al., 2012).

Além disso, algumas formulações antimicrobianas são amplamente utilizadas, com o objetivo de inibir a formação biofilme dental, como a clorexidina, porém com o uso prolongado podem causar diversos efeitos colaterais, como irritação gastrintestinal, manchas nos dentes, perda gustativas, queimaduras no tecido mole e gosto desagradável na boca (PAGORARO et al., 2015). Deste modo, é essencial desenvolver agentes terapêuticos com atividade antimicrobiana com efeitos colaterais reduzidos (CARTAXO-FURTADO et al., 2015).

2.3 *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Schinopsis brasiliensis é uma planta pertence à família Anacardiaceae, nativa do Nordeste do Brasil, sendo utilizada na medicina popular local (CARVALHO, 2009; CHAVES et al., 2011). Os nomes populares da *S. brasiliensis* diferem nas diversas localidades, na Bahia ela é mais comumente conhecida com braúna, baraúna e quebracho (CARVALHO, 2009; CHAVES et al., 2011).

Partes das plantas como as folhas, casca, caule, resina e frutos são usados como anti-inflamatórios em geral, para gripe, febre, tosse, diarreia, fraturas, e como antimicrobiano (ALBUQUERQUE, 2006; ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007). Além disso, demonstrou atividade antioxidante a partir da casca de *S. brasiliensis*, além de ação de filtro solar e uma possível nova formulação fotoprotetora (LIMA-SARAIVA et al., 2017). A população de Palmeiras, Distrito de Contendas do Sincorá, utiliza a casca de *S. brasiliensis* na forma de chá (decocção) para tratar dor de cabeça (DUARTE, 2008).

Em relação à sua descrição botânica, de acordo com Carvalho (2009), a *S. brasiliensis* é arbórea e espinhenta, de comportamento decíduo. A Braúna é uma das maiores árvores do bioma Caatinga. O caule é reto e bem conformado. A copa é quase

globosa e não muito densa. Os ramos são providos de espinhos fortes com comprimento nas pontas. Sua casca possui espessura de até 30 mm. As folhas são compostas pinadas, verde-escuro na face superior e pálidos na face inferior. Quando maceradas, apresentam fraco odor de resina. As flores são pequenas, brancas, glabras e suavemente perfumadas. O fruto é uma drupa alada e a semente dessa espécie é de forma obovóide e está envolta por um tegumento lenhoso (caroço) difícil de ser rompido (Figura 1).

Deste modo, a *S. brasiliensis* é uma espécie muito interessante para estudos científicos devido a rica presença de compostos químicos. Além disso, *S. brasiliensis* demonstra ter atividade biológica, principalmente antimicrobianas, devido a presença de compostos como: triterpenos, taninos pirogálicos, fenóis, flavonoides e alcaloides (CARDOSO et al., 2005; CHAVES et al., 2011). Pesquisas tem sido conduzidas com objetivo de buscar atividades antimicrobianas de *S. brasiliensis* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis* e *Enterococcus faecalis* (CHAVES et al., 2011; SARAIVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

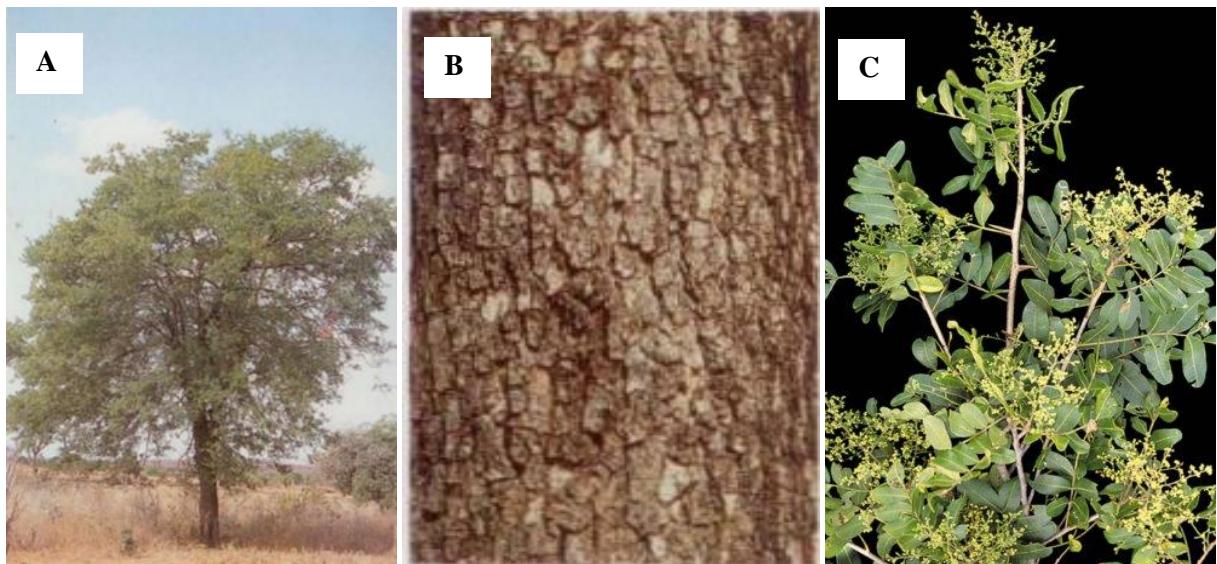


FIGURA 1: Fotos de *S. brasiliensis* Engler. A. Habitat. B. Tronco. C Folhas e Flores.

Fonte: Lorenzi, 1992.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico, frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) e subfrações (hexano, diclorometano e acetato de etila) das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler sobre *Streptococcus mutans* UA159.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os compostos fitoquímicos do extrato das folhas de *S. brasiliensis* através de caracterização dos metabólitos;
- Identificar as substâncias presentes no extrato das folhas de *S. brasiliensis* por meio cromatográfico;
- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do extrato etanólico, frações e subfrações do extrato das folhas de *S. brasiliensis* sobre *S. mutans* UA159;
- Avaliar a ação do extrato etanólico das folhas de *S. brasiliensis* na formação do biofilme de *S. mutans* UA159;
- Avaliar a ação do extrato etanólico das folhas de *S. brasiliensis* sobre a via glicolítica de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme;
- Avaliar a ação do extrato etanólico das folhas de *S. brasiliensis* sobre a aciduricidade de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme;
- Avaliar a ação do extrato etanólico das folhas de *S. brasiliensis* sobre a produção de polissacarídeos de *S. mutans* UA159 em modelo de biofilme.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal

A espécie vegetal foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), sendo uma área de reserva ambiental com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas com bioma caatinga, e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas. Essa área de preservação ambiental foi estudada quanto à composição da cobertura vegetal de 11034,34 hectares e seus limites que, indo para o leste, faz divisa através do riacho da Goiabeira, que também divide o município de Contendas do Sincorá e de Tanhaçu. A parte do oeste é dividida pela Ferrovia Centro Atlântica (FCA) e os limites do oeste estão próximos a serra da Cabeça Inchada (MATTEI, et al., 2006).

Para a coleta da planta, foram concedidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (N 12292-1) e a Autorização para atividade com finalidade científica (N 13258-1). A espécie foi anteriormente coletada e fotografada, e devidamente localizada e catalogada, tendo sido depositado a exsicata no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista, sob coordenação do Prof. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsicatas foram preparadas seguindo as orientações de Mori et al., (1989) e a identificação taxonômica foi feita por comparação no herbário e através de literatura (MORI, 1989). O registro das exsicatas depositadas são os números de vouchers 4931, 4952 e 4953. A atividade foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) cadastro Nº A7125E9.

4.2 Preparo do extrato etanólico

O extrato etanólico foi preparado a partir das folhas secas de *S. brasiliensis* (1,465kg), trituradas e foram levadas para a maceração exaustiva com etanol 99º GL, com agitação esporádica. Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até a eliminação do etanol, fornecendo o extrato etanólico (200g). Parte deste extrato foi separado para a avaliação da atividade biológica.

4.3 Preparo das frações

Parte do extrato etanólico (154,01g) foi dissolvido numa mistura de etanol / H₂O (1:1) e extraiu-se sucessivamente por partição sequencial (extração líquido-líquido) obedecendo à ordem de polarização crescente com hexano - HEX (3 x 100 mL), diclorometano - CH₂Cl₂ (3 x 100 mL), acetato de etila - EtOAc (3 x 100 mL) e butanol – BuOH (3 x 100 mL). Em seguida, concentraram-se em evaporador rotativo e secaram à temperatura ambiente. As frações foram submetidas aos ensaios antimicrobianos.

4.4 Preparo das subfrações

Para obtenção das subfrações, foram utilizadas aquelas frações que apresentaram atividade antimicrobiana, hexano, diclorometano e acetato de etila. A fração de butanol não foi subfracionada, visto que não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

As frações de hexano e acetato de etila foram subfracionadas por coluna filtrante, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm. As frações de hexano foram eluídas com HEX:metanol (MeOH) e acetato de etila com EtOAc: MeOH em gradiente crescente de polaridade finalizando com MeOH. Após remoção do solvente à vácuo com funil de Buchner, foi realizado análise através de cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa, foram reunidas 4 subfrações de hexano (H1, H2, H3 e H4) e acetato de etila (A1, A2, A3 e A4).

A fração de diclorometano foi subfracionada por cromatografia de coluna seca (sílica gel 60, 70-230 mesh, Merck), como eluente misturas de CH₂Cl₂: EtOAc: MeOH (7:2:1). Posteriormente, a coluna foi cortada em quatro partes, levando em consideração as cores e extraída com EtOAc: MeOH em gradiente crescente de polaridade finalizando com MeOH em um funil de Buchner. As subfrações obtidas após análise comparativa através de CCD, foram agrupadas fornecendo 4 subfrações (D1, D2, D3 e D4) e foram testadas quanto à atividade antimicrobiana (Figura 2).

A subfração D4 (4,8g) foi escolhida para ser fracionada por Cromatografia em coluna (CC), devido a sua boa atividade antimicrobiana e rendimento. Para o CC, a coluna de vidro de 5,5cm de diâmetro foi preenchida até a altura de 24 cm como fase estacionária sílica gel 60, e como eluente misturas de Clorofórmio (CHCl₃): EtOAc iniciando com a proporção 7:3 com gradiente crescente de polaridade finalizando com MeOH. Após

análise comparativa através de CCD, foram reunidas 13 subfrações: D4.1, D4.2, D4.3, D4.4, D4.5, D4.6, D4.7, D4.8, D4.9, D4.10, D4.11, D4.12 e D4.13. Destas subfrações, foram testadas apenas a D4.8, D4.11, D4.12 e D4.13, pois as outras subfrações tiveram baixo rendimento para realização do teste biológico (Figura 2).

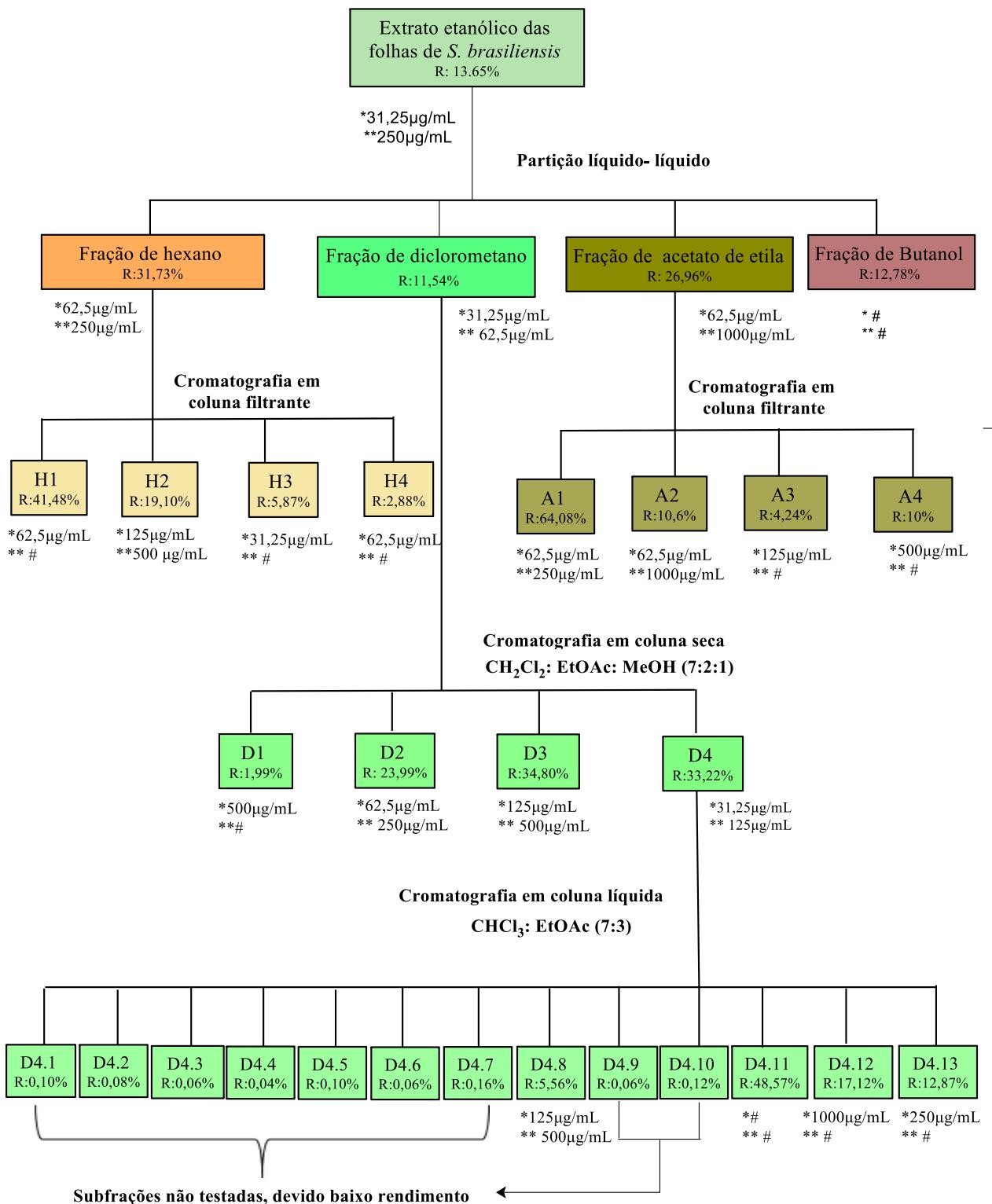


Figura 2. Fluxograma do fracionamento bioguiado dos extratos das folhas de *S. brasiliensis*.

Frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A), butanol e subfrações (H, D e A).

(*) CIM; (**) CBM; R: rendimento; (#) não foi observado atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

4.5 Estudo fitoquímico preliminar do extrato com reações de caracterização dos metabólitos

As análises fitoquímicas possibilitam a revelação qualitativa das diferentes classes de metabólitos especiais presentes na espécie vegetal em estudo, como flavonoides, esteroides e alcaloides (COSTA, 2000; REGO, 2012). Para a realização desses testes foi utilizado método de CCD com reveladores específicos para identificação e foram analisadas frente ao extrato etanólico, fração de diclorometano, subfrações D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12 e D4.13 de *S. brasiliensis*, esses extratos foram selecionados devido a boa atividade antimicrobiana e rendimento (Anexo A).

Para a análise de flavonoides utilizou-se a fase móvel CH₂Cl₂: EtOAc: MeOH (7:2:1). Na placa de sílica, borrifou-se o reagente cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v). A visualização das manchas efetuou-se à luz Ultravioleta (BIOTEC®), a 365 nm. Os flavonoides apareciam como manchas verdes fluorescentes enquanto os ácidos fenólicos surgiam como manchas azuis fluorescentes (Anexo A).

Para a análise de esteroides utilizou-se como fase móvel CH₂Cl₂: EtOAc: MeOH (7:2:1). O reagente de Liebermann-Burchard foi borrifado na placa e esta foi levada a aquecimento a 110 °C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas roxas no visível indicou a presença de esteroides (Anexo A).

Para a detecção de alcaloides utilizou-se como fase móvel CH₂Cl₂: EtOAc: MeOH (7:2:1). O reagente de Wagner foi borrifado na placa e o aparecimento de manchas castanho-avermelhadas, no visível, indicou a presença de alcaloides (Anexo A).

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

As subfrações D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12 e D4.13 de diclorometano tiveram os seus perfis cromatográficos avaliados por CG-EM (Anexo B). 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).

4.7 Microrganismo e cultivo

A cepa de *Streptococcus mutans* UA159 utilizada neste estudo, foi proveniente do Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia, UNICAMP (Universidade de Campinas, Piracicaba, São Paulo). A cepa foi descongelada (-80°C), incubado durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂ em caldo BHI com 1% glicose. Reiques 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.

4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. O inóculo de *S. mutans* UA159 foi realizado com uma concentração bacteriana final em torno de 1-2 x 10⁸ 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 x 10⁵ CFU/mL) e 10 µL do extrato etanólico, frações e subfrações das folhas de *S. brasiliensis* 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.

4.9 Determinação da 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* UA159. 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).

4.10 Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)

O inóculo de *S. mutans* UA159 foi padronizado em uma concentração final em torno de 1-2 x 10⁸ 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 x 10⁵ UFC/mL) e em seguida foram adicionados 10 µL do extrato etanólico e frações e subfrações das folhas de *S. brasiliensis*, 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).

4.11 Confecção dos discos para realização do biofilme

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 madril para ponta reta 18 odontológica, sendo os blocos de esmalte posteriormente fixados com fio ortodôntico. O fio ortodôntico com os fragmentos foi então fixado nas tampas dos tubos falcons de 15 mL, colocados nos respectivos tubos e esterilizados (Figura 3).

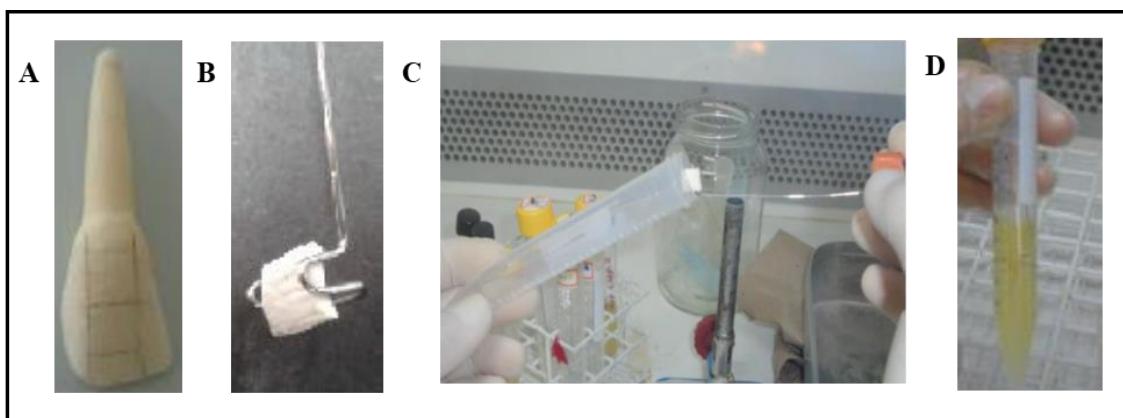


FIGURA 3. Sequência da confecção dos corpos de prova: A- incisivo inferior permanente bovino hígido com a demarcação do tamanho dos blocos de esmalte; B- fragmento dentário no aparato confeccionado com fio ortodôntico; C- superfície sólida para formação do biofilme no tubo Falcon; D- tubo com bloco de dente inserido no caldo BHI com sacarose a 1% e inóculo bacteriano.

4.12 Ensaio de Biofilme

4.12.1 Preparo do Inóculo e Incubação do *S. mutans*

S. mutans UA159 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 extrato etanólico de *S. brasiliensis*, às 10h00min e 16h00min, do terceiro dia até o quinto dia do período experimental (biofilme de 120

horas). O extrato etanólico das folhas da Braúna 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 4). O biofilme foi exposto aos respectivos tratamentos num total de seis vezes e os testes foram realizados em triplicata no número total de três experimentos ($n = 9$).

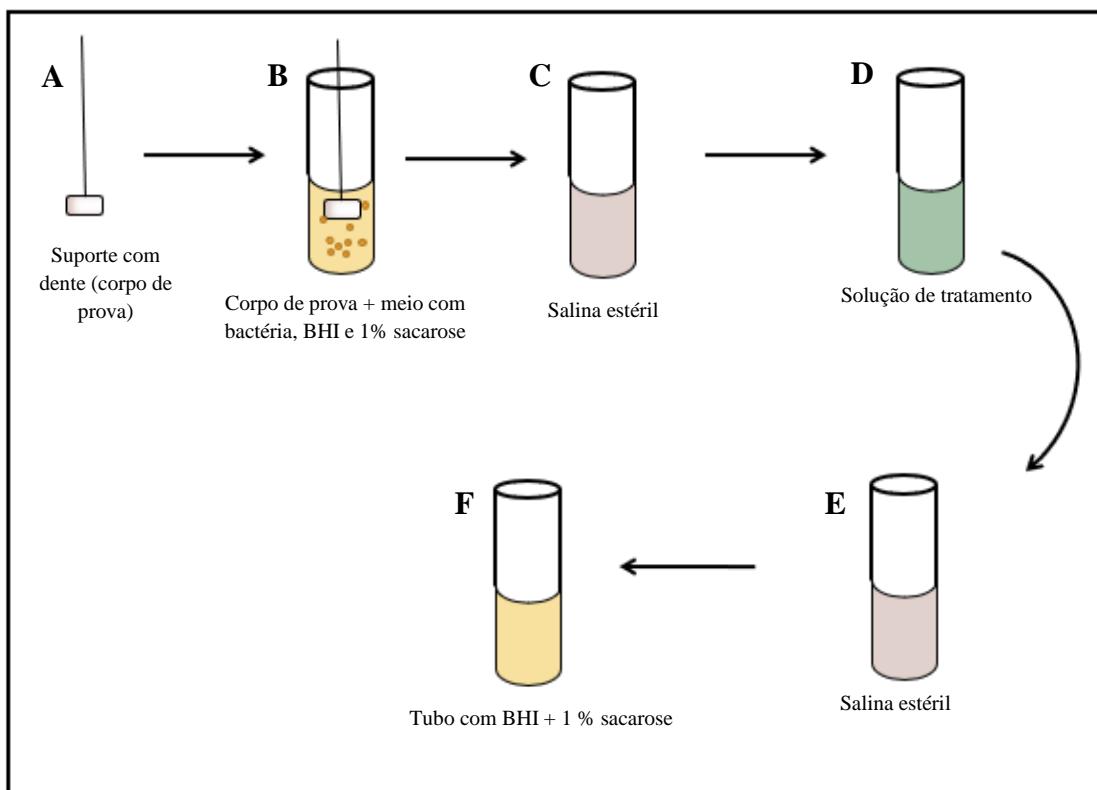


FIGURA 4: Representação das fases do ensaio de formação, *in vitro*, do biofilme por *S. mutans*: A- Corpo de prova; B - Corpo de prova já com biofilme; C- Lavagem em salina a 0,9%; D- Inserção da superfície sólida nas soluções de tratamento por duas vezes (por tempo de 30 segundos); E- lavagem em salina; F- Inserção no tubo de origem (contendo caldo BHI e sacarose). Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia.

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 5).

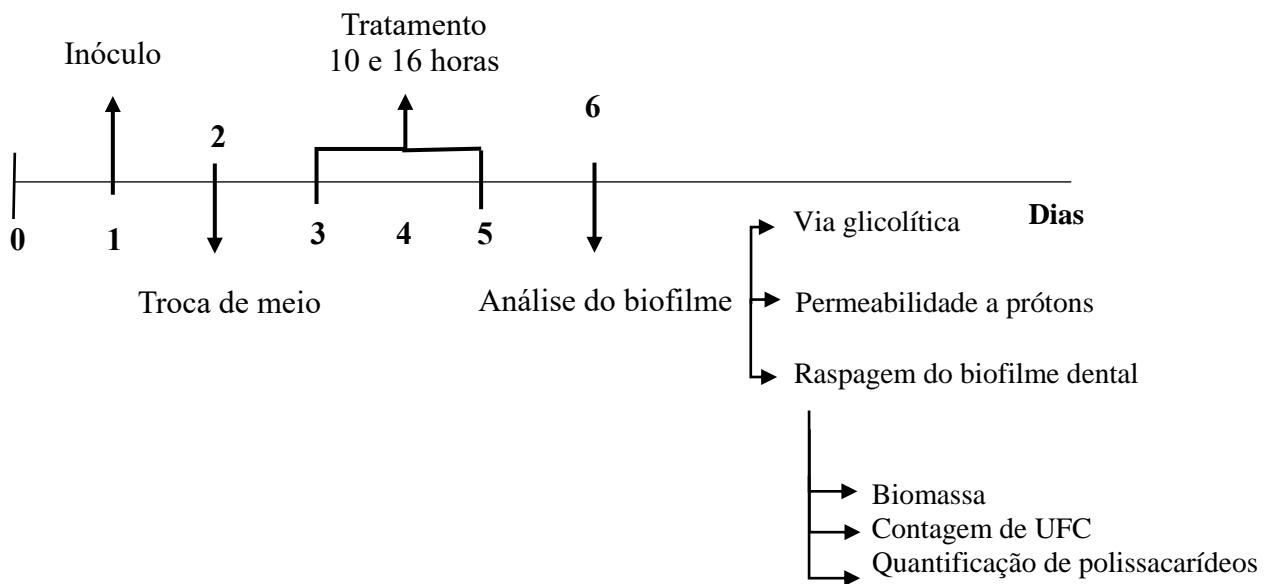


FIGURA 5: Fluxograma de trabalho para ensaio de biofilme.

4.12.2 Biomassa (peso seco)

Após o biofilme formado, os aparelhos e disco de esmalte foram devidamente raspados com espátula odontológica estéril, o material obtido da raspagem foi colocado em tubos de vidro contendo 4 mL de salina estéril. Os tubos foram então levados ao sonicador para a dissolução do biofilme e então centrifugado a 14000 rpm por 10 min. Retirou-se o sobrenadante e levou ao dissecador para a secagem completa do biofilme. Após secagem foi feita a pesagem para a determinação do peso seco (Figura 5).

4.12.3 Viabilidade bacteriana (Contagem de UFC)

Foi feita a raspagem dos discos e aparelhos como descrito anteriormente no item 4.8. 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 μL do biofilme diluído em placas contendo BHI ágar. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, foi realizada a leitura visualmente para avaliação do crescimento, por meio da observação e contagem das colônias (Figura 5).

4.12.4 Quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali)

Após a raspagem e sonicação como descrito no item 4.13.2 foi feita à separação dos polissacarídeos solúveis e insolúveis em água e solúveis em álcali. Para tanto, foi feita a separação dos solúveis e insolúveis em água através de centrifugação em 3800 rpm por 10 min 4°C. O sobrenadante (solúvel) foi transferido para novo tubo e adicionado etanol gelado, o pellet formado (insolúvel) foi adicionado 2 ml de água destilada. O solúvel em álcali foi obtido à partir da retirada de 1,5 mL do tubo contendo o insolúvel, essa amostra foi então centrifugada a 14000 rpm por 10 min e a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi levado ao dissecador para a secagem por completo da amostra. A quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali) foi determinada por ensaios colorimétricos conforme detalhado por Koo et al. (2003) (Figura 5).

4.12.5 Queda de pH (via glicolítica)

Os biofilmes de *S. mutans* UA159 formados e tratados com o extrato etanólico das folhas de *S. brasiliensis* na concentração de 25 mg/mL, como descrito anteriormente receberam o último tratamento no quinto dia de crescimento. Após esse tratamento, os biofilmes foram lavados em tampão fosfato por três vezes, posteriormente incubados em salt solution (50 mM KCl e 1 mM MgCl₂) com o pH 7,0 por 1 hora (37 °C, 5% de CO₂). Após a incubação, os excessos de biomassa formados nos aparelhos foram retirados ficando somente os biofilmes aderidos ao disco de esmalte. Os biofilmes foram então colocados em becker com 10,8 mL de salt solution (50 mM KCl e 1 mM MgCl₂) e 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 5).

4.12.6 Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons

Após o último tratamento de 25 mg/mL do extrato etanólico (quinto dia), os biofilmes foram incubados em tampão fosfato (pH 7,2) por 1 hora. Após a incubação, os excessos de biomassa formados nos aparelhos foram retirados ficando somente os

biofilmes aderidos ao disco de esmalte dentário. Os biofilmes foram então colocados em becker com 10 mL de salt solution (50 mM KCl e 1 mM MgCl₂) e o pH corrigido para 4,2 com solução de 100 mM HCl com 50 mM KCl ou 100 mM KOH com 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 l-Butanol para ruptura da membrana celular sendo pH aferido novamente nos intervalos de 82 e 120 minutos (MARQUIS et al., 2004) (Figura 5).

4.13 Análises estatísticas

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

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, J. et al. Biology of Oral Streptococci. **Microbiol Spectrum**, v. 6, n. 5, p. 1–18, 2018.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: A study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE; OLIVEIRA, R. F. DE. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 156–170, 2007.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, n. 1, p. 127–142, 2005.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance : a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância : um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992–1000, 2010.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 2, p. 89–99, 2003.
- BARBIERI, Dicler SV et al. Antiadherent activity of Schinus terebinthifolius and Croton urucurana extracts on in vitro biofilm formation of Candida albicans and Streptococcus mutans. **Archives of oral biology**, v. 59, n. 9, p. 887-896, 2014.
- BELLI, W., D.; BUCKLEY, R.; MARQUIS "Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by Streptococcus mutans GS-5." Canadian journal of microbiology, p. 785-791, 1995.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A química de produtos naturais do Brasil do Século XXI. **Quimica Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- BOLZANI, S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure Appl. Chem**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*- Derived Glucosyltransferases : Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Research**, v. 45, n. (1), p. 69–86, 2011.
- 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.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery . **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 91, p. 1–7, 2019.

CAMPOS, S. . et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. DE A.; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CARTAXO-FURTADO, N. A. D. E. . et al. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 4, p. 1091–1096, 2015.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. n- Alquil e n-alquenil fenóis identificados de *Schinopsis brasiliensis* (ANACARDIACEAE). **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, v. 1, p. 2–3, 2005.

CARVALHO, P. E. R. Braúna-do-Sertão *Schinopsis brasiliensis*. **Circular Técnica - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, n. 222, p. 1–9, 2009.

CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDE, V. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde**, p. 11–19, 2006.

CHAVES, T. P. et al. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 11–17, 2011.

CHEN, Y. et al. Lollipop containing *Glycyrrhiza uralensis* extract reduces *Streptococcus mutans* colonization and maintains oral microbial diversity in Chinese preschool children. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2019.

CHEN, P.; YU, S.; ZHU, G. The psychosocial impacts of implantation on the dental aesthetics of missing anterior teeth patients. **Bristish Dental Journal**, v. 213, n. 11, p. E20, 2012.

COSTA, A. F. Farmacognosia experimental. Lisboa: Fundação Calouste, 2000.

CRUZ, M. P. et al. Antinoceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–29, 2016.

DEWHIRST, F. E. et al. The Human Oral Microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010.

DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; S. FILHO, A. O.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX International Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2008, São Paulo. **XX International Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2008. p. 03.032.

- FONTANA, M.; GONZALEZ-CABEZAS, C. Evidence-Based Dentistry Caries Risk Assessment and Disease Management. **Dental Clinics of NA**, v. 63, n. 1, p. 119–128, 2019.
- FRANCISCO, K. S. F. et al. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GROSS, E. L. et al. Beyond Streptococcus mutans : Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- 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.
- HENSHAW, M. M.; GARCIA, R. I.; WEINTRAUB, J. A. Oral Health Disparities Across the life Span. **Dental Clinics of North America**, v. 62, n. (2), p. 177–193, 2018.
- HICKL, J. et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of Streptococcus mutans. **PLoS ONE**, v. 13, n. (12), p. 1–24, 2018.
- JAUHARI, D. et al. Comparative Evaluation of the Effects of Fluoride Mouthrinse , Herbal Mouthrinse and Oil Pulling on the Caries Activity and Streptococcus mutans Count using Oratest and Dentocult SM Strip Mutans Kit. **Int J Clin Pediatr Dent.**, v. 8, n. (2), p. 114–118, 2015.
- 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.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- JUNIOR, V. F. DA V. Divulgação Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro : aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosi**, v. 18, n. 2, p. 308–313, 2008.
- KAMIYA, R. U.; HOFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of Streptococcus mutans with different mutacin-producing phenotypes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 626–635, 2008.
- KARYGIANNI, L. et al. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms : A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. January, p. 1–17, 2016.
- KASSEBAUM, N. J. et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors.

Journal of Dental Research, v. 96, n. 4, p. 380–387, 2017.

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.

KAWASHITA, Y.; KITAMURA, M.; SAITO, T. Early Childhood Caries. **International journal of Dentistry**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

KILIAN, M. The oral microbiome – friend or foe? **European Journal of Oral Sciences**, v. 126, p. 5–12, 2018

KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 5, p. 1302–1309, 2002.

KOO, H. et al. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 2, p. 542-6, Feb 2006.

KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt -farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 782–789, 2003.

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, J. A.; BURNE, R. A. A model efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 11, p. 3247–3255, 2008.

LIMA, J. E. DE O. Cárie dentária : um novo conceito. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 12, n. 6, p. 119–130, 2007.

LIMA-SARAIVA, S. R. G. DE et al. Chemical Analysis and Evaluation of Antioxidant , Antimicrobial , and Photoprotective Activities of *Schinopsis brasiliensis Engl . (Anacardiaceae)*. **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 10, 2017.

LISTL, S. et al. Global economic impact of dental diseases. **Journal of dental research**, v. 94, n. 10, p. 1355-1361, 2015.

LIU, Yucui et al. Anti-biofilm Activities from *Bergenia crassifolia* Leaves against *Streptococcus mutans*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1738, 2017.

LOSSO, E. M. et al. Severe early childhood caries : an integral approach. **Jornal de pediatria**, v. 85, n. 4, p. 295–300, 2009.

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

MARSH, P. D. implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v. 7, p. 1–7, 2006.

- MATSUMOTO-NAKANO, M. Role of Streptococcus mutans surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. (1), p. 22–29, 2018.
- MATSUI, R.; CVITKOVITCH, D. Acid tolerance mechanisms utilized by Streptococcus mutans. **Future Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 403–417, 2011.
- MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis : causes , consequences , and management. **Frontiers in public health**, v. 2, n. September, p. 1–8, 2014.
- MORI, S.A.; Mattos Silva, L.A.; Lisboa, G. & Coradin, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. CEPLAC, 1989.
- MUSSI-DIAS, V. et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 261–266, 2012.
- 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.
- NGABAZA, T.; MOENO, S.; PATEL, M. Anti-acidogenic and anti-biofilm activity of 5,6,8-trihydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 149–152, 2018.
- 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 Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 2720–2722, 2002.
- PAGORARO, J. et al. Efeitos Adversos do Gluconato de Clorexidina à 0,12%. **Journal of Oral Investigations**, v. 3, n. 1, p. 33–37, 2014.
- 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.
- PITTS, N; ZERO, Domenick. White Paper on Dental Caries Prevention and Management. **FDI World Dental Federation**, p. 1-59,2012.

- REGO, E. A. Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. **Universidade dos açores departamento de ciências tecnológicas e desenvolvimento**, p. 101, 2012.
- RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará , nordeste do Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014.
- RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities : a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018.
- RODRIGUES, J. Z. DE S. et al. Antimicrobial activity of Lactobacillus fermentum TcUESC01 against Streptococcus mutans UA159. **Microbial Pathogenesis**, p. 104063, 2020.
- SARAIWA, A. M. et al. In vitro evaluation of antioxidant , antimicrobial and toxicity properties of extracts of Schinopsis brasiliensis Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 1724–1731, 2011.
- SEKIYA, M. et al. Proton-pumping F-ATPase plays an important role in Streptococcus mutans under acidic conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 666, n. March, p. 46–51, 2019.
- SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51-59, 2007.
- SEOW, W. K. Early Childhood Caries. **Pediatric Clinics of NA**, v. 65, n. 5, p. 941–954, 2018.
- SHENG, J.; MARQUIS, R. E. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 262, n. 1, p. 93–98, 2006
- SILVA, P. et al. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast : Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 6, 2012.
- 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
- STURR, M. G.; MARQUIS, R. E. Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F- ATPases of oral lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2287–2291, 1992.
- STRUŻYCKA, I. The Oral Microbiome in Dental Caries. **Polish Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 127–135, 2014.
- VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, p. 763–778, 2018.

- VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural Products : Perspectives and Challenges for use of Brazilian Plant Species in the Bioeconomy. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 91, p. 1–7, 2019.
- VERMA, D. et al. Insights into the human oral microbiome. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 4, p. 525–540, 2018.
- VIEGAS, C.; BOLZONI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- WADE, W. G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 137–143, 2013.
- WONG, A.; SUBAR, P. E.; YOUNG, D. A. Dental Caries An Update on Dental Trends and Therapy. **Advances in Pediatrics**, v. 64, n. 1, p. 307–330, 2017.
- WHO. Guideline : Sugars intake for adults and children. **Geneva: World Health Organization**, 2015.
- YATSUDA, R. et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 183–189, 2005.
- ZAURA, E. et al. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, n. June, p. 1–8, 2014.
- ZOLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal Reference Standards : applications , defi nitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. (1), p. 1–21, 2013.
- ZHANG, Y. et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 883–893, 2018.

CAPÍTULO I

**Antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions and
subfractions from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler
against *Streptococcus mutans* UA159**

Antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions and subfractions from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler against *Streptococcus mutans* UA159

Brenda Oliveira Lima¹, Rafael Silva Almeida¹, Manuela Ribeiro Passos², Jeisa Zielle de Souza Rodrigues¹, Nayara Silva de Macêdo¹, Isabella Porto Santos¹, Louise Soares Pita¹, Iago Almeida Santos¹, Paulo Henrique Santana Silveira¹, Caio Ferraz Cabral de Araújo¹, Vitor de Oliveira Campos¹, Vanessa Frutuoso Munduruca¹, Luccas de Oliveira Negrão Ricardo¹, Bruno Oliveira Moreira¹, Lucas Miranda Marques¹, Mariluze Peixoto Cruz¹, Regiane Yatsuda^{1*}.

1 Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, 58 Hormindo Barros Street, Vitória da Conquista - Bahia BA CEP: 45029-094, Brazil.

2 University of Santa Cruz (UESC), Soane Nazaré de Andrade Campus, Jorge Amado Highway, 16 km, Salobrinho, Ilhéus - Bahia BA CEP 45662-900, 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

Caries is a multifactorial and infectious oral disease that affects the majority of the world's population. *Streptococcus mutans* is one of the main etiologic agents for the formation of dental biofilm due to its adhesion, acidogenicity and acidity, which are the main factors associated with caryogenesis. Medicinal plants can be an alternative to antimicrobial agents that allow the control of microbial biofilms. In this context, an *Schinopsis brasiliensis* Engler, popularly known Braúna in Brazil, has been much appreciated locally in popular medicine, due to the presence of chemical compounds that have biological activity, mainly antimicrobial. Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions hexane (H), dichloromethane (D), ethyl acetate (A), butanol and subfractions (H, D and A) of the

leaves of *S. brasiliensis* against *S. mutans* UA159. For this, the tests of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum inhibitory concentration of adhesion (MICA) were performed. The activity of the ethanolic extract was evaluated in relation to inhibition of biofilm formation, its effects on glycolysis and membrane permeability to protons, and analysis of polysaccharide formation. The lowest MIC values were obtained with the ethanolic extract, dichloromethane, H3 and D4 subfractions at 31.25 µg/mL. In relation to MBC, bactericidal activity was demonstrated in the ethanolic extract, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, H2, D2, D3, D4, D4.8 A1 and A2. Butanol, H1, H3, H4, D4.11, D4.12, D4.13 A3 and A4 did not show MBC at the maximum concentration tested at 1000 µg/mL. In biofilm analyzes, treatment with the ethanol extract of *S. brasiliensis* (2 g/mL) in the tested concentration was able to reduce biomass, insoluble and alkaline soluble glucans compared to the control biofilm ($p < 0.05$). The ethanolic extract affected the acid production of the biofilm ($p < 0.05$), and also altered the acid tolerance of *S. mutans* UA159 cells in biofilms. The main bioactive compounds found in the dichloromethane fraction were thymol, ethyl gallate, gallic acid and methyl gallate. This is the first report of antimicrobial activity of ethanolic extract from *S. brasiliensis* against *Streptococcus mutans* biofilm. Thus, the ethanolic extract, fractions and subfractions of the leaves of *S. brasiliensis* demonstrated therapeutic potential for use in preventing the formation of dental caries, as it presented antimicrobial activity and inhibited important virulence factors of *S. mutans* UA159. More studies will be conducted in the future to elucidate the antimicrobial compounds in the other fractions of the ethanolic extract, and to elucidate the mechanisms of action of these compounds against *S. mutans*.

Keywords: Caries; *Streptococcus mutans*; medicinal plants; Antimicrobial; *Schinopsis brasiliensis* Engler; biofilm, aciduric, acidogenic.

1. Introduction

Caries is a persistent oral infectious disease most prevalent in the world, although frequent in childhood, they affect people of all ages throughout life.^{1,2} *Streptococcus mutans* is considered one of the most important pathogens on the formation of dental biofilm in humans.³ The main virulence factors of *S. mutans* that is associated with the cariogenic potential are adhesion, acidogenicity and acid tolerance.⁴ They are gram-positive, facultative anaerobic, can synthesize glucans from diet sucrose by glucosyltransferases (Gtfs).⁵ *S. mutans* produces organic acids as a product of carbohydrate metabolism, which lowers the pH of the dental biofilm, leads to the dissolution of the teeth and, consequently, formation of a cavity, and sometimes, the tooth loss.^{6,2}

Traditional biofilm prevention and control methods consist of mechanical removal and use of antibacterial.⁷ However, the increase in strains resistant to antimicrobials and adverse effects are a growing concern over the years.⁸ Therefore, it is important to use new herbal compounds that can be used as an alternative treatment for oral diseases that are safe, efficient and economical for the population.⁹ In addition, in Brazil there is a huge biodiversity, being responsible for more than 15% of all species on the planet, and for this reason, it is rich in active biological compounds that can be used as medicines or as models for discovering new medicines.¹⁰

In this context, *Schinopsis brasiliensis* Engler is a plant belonging to the Anacardiaceae family, native to Northeast Brazil, and it is popularly known as “braúna, baraúna, quebracho”.^{11,12} It is one of the most important medicinal plants for communities located in the Caatinga in Northeastern Brazil where people use its bark in various mixtures designed to treat flu symptoms, colds, diarrhea, dysentery, fractures, general inflammations, general infections and sexual impotence.¹³⁻¹⁶ Antimicrobial activity of *S. brasiliensis* against both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria were demonstrated before.^{17,18} The antibacterial activity of *S. brasiliensis* extracts against resistant strains of *Staphylococcus aureus* has been reported.^{19,20} Despite the importance and widespread use of *S. brasiliensis* in folk medicine, there are few experimental studies that seek to evaluate its pharmacological and phytochemical properties.²⁰

Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) and subfractions of the leaves of *S. brasiliensis* against *S. mutans* UA159 in planktonic and biofilm models. This is the first report of antimicrobial activity of ethanolic extract from *S. brasiliensis* against *Streptococcus mutans* biofilm.

2. Material and Methods

2.1 Plant Material

The collection of the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler was carried out in FLONA - National Forest of Contendas do Sincorá (S13°55'286" and W041°06'942", at 352m height). The samples were collected after a collection authorization was granted for an activity with a scientific objective from the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) (license nº 13258-1). The plant material was identified by Prof. Avaldo de Oliveira S. Filho, and voucher specimens (nº HUESBVC 4931, 4952 and 4953) were deposited in the Herbarium of Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil.

2.2 Preparation of ethanolic extract, fractions and subfractions for microbiological tests

S. brasiliensis leaves were dried, crushed and macerated exhaustively in 99°GL ethanol for 72 hours for the extraction of bioactive compounds. Then, filtered and concentrated on the rotary evaporator under reduced pressure at 45°C to obtain dry ethanolic extract. The final average yield of the ethanolic extract was 13.65% of the dry weight of the leaves. Part of the ethanolic extract was dissolved in an ethanol/H₂O mixture (1: 1) and partitioned successively sequentially by liquid-liquid extraction, in increasing polarity order with hexane -HEX (3 x 30ml), dichloromethane – CH₂Cl₂ (3 x 30ml), ethyl acetate - EtOAc (3 x 30ml) and butanol - BuOH (3 x 30 mL), providing after evaporation of solvents in a rotary evaporator and dried at room temperature, providing the fractions of hexane (SBH), dichloromethane (SBD), ethyl acetate (SBAE) and butanol (SBB).²¹⁻²³

The bioguided fractionation of the extracts of the leaves of *S. brasiliensis*, were selected by previous antimicrobial activity and yield of the extracts. Therefore, the SBH e SBAE soluble fractions of the ethanolic extract of the leaves (48.88 g and 41.53 g) were subjected to subfractionation by a filter column, using silica gel 60 with a particle diameter between 0.063-0.200 nm as the stationary phase. The hexane fractions were

eluted with HEX: Methanol (MeOH) and ethyl acetate with EtOAc: MeOH in increasing gradient of polarity ending with MeOH. After removing the solvent under vacuum with a Buchner funnel, thin layer chromatography (TLC) analysis was performed, 4 subfractions of each were collected. The subfractions of hexane fractions were H1, H2, H3 and H4, and from ethyl acetate were A1, A2, A3 and A4.

The dichloromethane fraction was subfractioned by dry column chromatography (silica gel 60, 70-230 mesh, Merck), as eluent mixtures of CH₂Cl₂: EtOAc: MeOH. Subsequently, the column was cut into four parts, taking into account the colors and extracted with EtOAc: MeOH in an increasing polarity gradient, ending with methanol in a Buchner funnel. The subfractions obtained after comparative analysis using TLC, were grouped providing 4 subfractions (D1, D2, D3 and D4) (Figure 1).

Subfraction D4 (4.8g) was subjected to fractionation in column chromatography (CC) using silica gel 60 with a particle diameter between 0.035-0.070 nm and chloroform (CHCl₃): EtOAc mixtures, starting with the ratio 7: 3 with increasing gradient of polarity ending with MeOH. After TLC analysis, 13 subfractions were collected (Figure 1).

2.3 Phytochemical study of the extracts of the *S. brasiliensis*

Phytochemical analysis of ethanolic extract, dichloromethane, D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12 and D4. 13 of *S. brasiliensis* leaves was carried out using standard methods of chromatography to identify the mainly constituents. The solvent systems used were DCM: EtOAc: MeOH (7:2:1). Phytochemical tests for the identification of flavonoids, sterols and alkaloids were carried out using the following reagents and chemicals: The presence of flavonoids using aluminum chloride - methanol solution 1%; Sterols with Liebermann-Burchard Reagent and alkaloids were detected using Wagner's Reagent.^{24,25}

2.4 Analysis of the subfractions of *S. brasiliensis* by gas chromatography coupled to mass spectrometry

Subfractions D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12 and D13, were analyzed by gas chromatography coupled to mass detector (GC-MS). Before being analyzed by gas chromatography, the samples were subjected to silylation derivatization. For this reaction, 3 mg of the sample were weighed into a vial, where he was diluted in 60 µL of pyridine. It was added 100 µL of the reaction mixture of N, O-Bis (trimethylsilyl)

trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich®) to this solution. This mixture was heated at 70 °C for 30 minutes and 1 µl of the mixture was injected into the GC-MS.²⁶

Shimadzu® GC-MS (QP2010SE-GC2010 Plus) was used using Rtx-5MS fused silica capillary column (30 m, 0.25 µm internal diameter, 0.25 µm film) and helium as the carrier gas. The temperature used in the injector, detector and interface of the GC- EM system was 290 °C. The initial temperature of the analysis was 80 °C for 5 min, increasing from 285 °C at 4 °C/ min. The final temperature remained at 285 °C for 40 minutes.²⁶ The mass detector operated with electron impact ionization (70 eV) and mass scanning in the range of 30 to 600 Da. The identification of the compounds was performed by comparing the mass spectral of the samples with those in the equipment database (NIST 08, FFNSC1.3 and WILEY8).

2.5 Microorganisms

Streptococcus mutans UA159 was used in the antimicrobial tests as the cariogenic bacteria. *S. mutans* was incubated for 24 hours, at 37 °C and 5% CO₂ in Brain Heart Infusion broth (BHI broth, KASVI) and stored at - 80°C.

2.6 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Serial dilution was carried out with the ethanolic extract, fractions and subfractions (A1–A4, H1–H4, D1–D4, D4.8, D4.11, D4.12 and D4.13) of *S. brasiliensis* leaves in the concentration ranging from 1000 to 31.25 µg/mL. For MIC determination, the starting inoculum was 1-2 x 10⁸ CFU/mL. This test was performed in 96 wells 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% CO₂.²⁷ In the wells where there was no visual growth, 20 µL of the resazurin dye (Sigma©) was added. After 20 minutes of incubation with resazurin the presence of blue color indicated absence of growth, pink color, presence of bacterial growth.²⁸ 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 µL) of suspensions from the wells that there was no bacterial growth were 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).

2.7 Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA)

To determine the MICA, the same procedure of MIC was followed; however, the medium was supplemented with 1% of sucrose, and ethanolic extract, fractions and subfractions of *S. brasiliensis* leaves were tested with sub-MIC concentrations. After the incubation for 24 hours, 5% CO₂, at 37°C, the plates were washed three times with saline solution and stained with 0.1% crystal violet, and followed by another washing with saline solution for removing dye excess.²⁷ The visual reading of stained was done by comparison to the controls. MICA was defined as the lowest concentration that allowed no visible cell adherence on the surface. Tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9)

2.8 Biofilm Assays

Biofilms of *S. mutans* UA159 were formed on fragments of bovine tooth placed in a vertical position in BHI culture with 1% of sucrose at 37 °C and 5% CO₂ for 5 days, as described by Koo et al. (2003)²⁹, Duarte et al. (2003)³⁰ and Rodrigues et al. (2020)²⁷. The starting inoculum was 1-2 x 10⁸ CFU/mL. In which 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 ethanolic extract of the leaves of *S. brasiliensis* (50 mg/mL), or vehicle control (saline 0,9% – negative control) or chlorhexidine 0.12% (positive control). The ethanolic extract was chosen due to its good antimicrobial activity and its higher yield. The biofilms were exposed to the treatments for 1 min, double-dip rinsed in a sterile saline solution and transferred to fresh culture medium. The culture medium was replaced daily. Each biofilm was exposed to the respective treatments in 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 Koo et al. (2003).²⁹

The effects of the ethanolic extract from *S. brasiliensis* on glycolysis were measured by standard pH drop test in biofilm model as previously described by Belli et al. (1995).³¹ Biofilms of *S. mutans* formed UA159 and treated with a concentration of 25 mg/mL, as previously described, received the last treatment on the day of growth. After this treatment, 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.³¹

The test Proton Permeability was also done with the same concentration of ethanolic extract (25 mg/mL), and *S. mutans* biofilms were initially washed with salt solution (50 mmol·L⁻¹ KCl plus 1 mmol·L⁻¹ MgCl₂). Subsequently, they were incubated in salt solution at a constant pH value 7.2 and adjusted to the pH to approximately 4.6. The subsequent rise in pH associated with 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 membrane. A rapid rise in pH followed, indicate of loss of ΔpH 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.³² Tests were conducted in sixplicate at three different times (n = 18).

2.9 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 Kruskal-Wallis test, and for parametric distribution, analysis of variance

(ANOVA) followed by Dunn's Multiple Comparing test. The level of significance was set at 5%.

3. Results

The ethanolic extract of the leaves of *S. brasiliensis* (1.465 kg), after filtration, was concentrated, yielding 13.65% of the ethanolic extract in relation to the weight of the leaves. Then, approximately (154,01g) of this ethanolic extract was subjected to partition extraction, following an increasing polarity gradient. After evaporation, four fractions were obtained in the following yields: 31.73% (hexane), 11.54% (dichloromethane), 26, 96% (ethyl acetate) and 12.78% (butanol). After fractionation, the fractions of hexane, dichloromethane and ethyl acetate were subfractionated and gave rise to hexane subfractions (H1: 41.48%, H2: 19.10%, H3: 5.87% and H4: 2.88 %), dichloromethane (D1: 1.99% D2: 23.99%, D3: 34.80% and D4: 33.22%) and ethyl acetate (A1: 64.08%, A2: 10.6%, A3: 4.24% and A4: 10%). Subfraction D4 was subfractioned in thirteen dichloromethane subfractions (D4.1: 0.10%, D4.2: 0.08%, D4.3: 0.06%, D4.4: 0.04%, D4.5: 0.10%, D4.6: 0.06%, D4.7: 0.16%, D4.8: 5.56%, D4.9: 0.06%, D4.10: 0.12% D4.11: 48.57%, D4.12: 17.12% and D4.13: 12.87%).

The qualitative phytochemical screening revealed the presence of various bioactive compounds such as flavonoids in the ethanolic extract, dichloromethane and subfractions D2, D3, D4 D4.8, D4.12 and D4.13. The presence of steroids was demonstrated in the ethanolic extract, dichloromethane, subfraction D3, D4 and D4.12. We did not observe the presence of alkaloids in the tested extracts (Table 1).

The analysis of the chemical profile was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry of D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12 and D4.13 subfractions. It was possible to identify several substances as gallic acid, ethyl gallate and methyl gallate were the major compounds identified. The major compounds of D1 subfraction were glycerol (87.89%), thymol (0.11%) and linolenic acid (0.10%); in D2 subfraction were ethyl gallate (49.7%), gallic acid (2.79%) and protocatechuic acid (1.12%); in D3 subfraction were gallic acid (13.68%), glycerol (18.98%) and 3,4,5 trihydroxycyclohexene-1carboxylic acid (2.16%); In the D4 subfraction, were found glycerol (14.90%), gallic acid (12.32%) and 3,4,5 trihydroxycyclohexene-1carboxylic acid (3.68%); The compounds found in D4.8 subfraction were methyl gallate (45.68%)

and ethyl gallate (54.32%); In D4.12 were found glycerol (35.07%), tetradecanoic acid (0.66%) and gallic acid (12.24%). In D4.13 subfraction were identified 3,4,5 trihydroxycyclohexene-1carboxylic acid (16.97%), gallic acid (3.70%) and lactic acid (3.01%). In D3, D4, D4.12 and in D4.13 subfractions, we observed the presence of sugar (Table 2).

Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the extracts *S. brasiliensis* against *S. mutans* UA159 were determined *in vitro*. The lowest MIC values were obtained with the ethanolic extract, dichloromethane, H3 and D4 was 31.25 µg/mL; Hexane, ethyl acetate, H1, H4, A1, A2 and D2 showed MIC at the concentration of 62.5 µg/mL; H2, D3, D4.8 and A3 was 125 µg/mL; D4.13 was 250 µg/mL; A4 and D1 was 500 µg/mL and D4.12 at 1000 µg/mL. Butanol and D4.11 did not showed MIC at the maximum concentration tested. The MBC of the dichloromethane was 62.5 µg/mL; D4 was 125 µg/mL; Etanolic extract, hexane, A1 and D2 was 250 µg/mL; H2, D2, D3, D4.8 was 500 µg/mL; Ethyl acetate and A2 was 1000 µg/mL. Butanol, H1, H3, H4, D4.11, D4.12, D4.13 A3 and A4 did not show CBM at the maximum concentration tested at 1000 µg/mL. The extracts of the leaves of *S. brasiliensis* tested with sub-MIC concentrations did not inhibit adherence of *S. mutans* UA159 (Table 3).

After the determination of the antimicrobial activity of the ethanolic extract fractions and subfractions of the leaves of *S. brasiliensis* on planktonic cells of *S. mutans* UA159, ethanolic extract of *S. brasiliensis* were tested in a biofilm model to evaluate the viability of *S. mutans*, as described in Table 4. The biofilm treated with the ethanolic extract *S. brasiliensis* at 50 mg/mL ($1,54 \times 10^5 \pm 4,5 \times 10^4$ CFU/mL) and Chlorhexidine 0.12% ($6,9 \times 10^1 \pm 1,40 \times 10^1$) were able to reduced the *S. mutans* viable cells in biofilms when compared to the saline treatment ($7.39 \times 10^6 \pm 4.43 \times 10^6$ CFU/mL) ($p < 0.05$). There was not statistical difference between the antimicrobial activity of the ethanolic extract and chlorhexidine 0.12% ($p > 0.05$).

The biofilms were also analyzed for dry weight, the biomass of biofilm (Table 5). The treatment with chlorhexidine 0.12% reduced the total biomass of biofilm to 8.15 ± 4.98 mg per biofilm and the ethanolic extract reduced to 28.64 ± 10.17 mg per biofilm, while the biomass of saline control was 36.15 ± 8.60 mg per biofilm ($p < 0.05$).

The quantity of glucans soluble in alkali was reduced by the ethanolic extract (33.01 ± 5.49 mg per biofilm) in comparison to the control biofilm (37.58 ± 8.17 mg per biofilm) ($p < 0.05$). Chlorhexidine was able to reduce the production of glucans soluble in alkali in the biofilms (5.75 ± 1.89 mg per biofilm) ($p < 0.05$). The soluble glucans from the biofilms treated with ethanolic extract did not differ from the concentrations in the biofilm treated with saline ($p > 0.05$). Chlorhexidine was able to reduce the production of soluble glucans (0.42 ± 0.036 mg per biofilm) with statistical difference compared to saline (0.69 ± 0.04 mg per biofilm) and ethanolic extract biofilm (0.68 ± 0.04 mg per biofilm) ($p < 0.05$). The insoluble glucans concentrations from the biofilms treated with ethanolic extract (24.67 ± 4.90 mg per biofilm) and chlorhexidine (15.32 ± 8.36 mg per biofilm) were reduced in the biofilm treated comparing to the saline treated biofilm (28.87 ± 6.97 mg per biofilm) ($p < 0.05$).

Acid production by *S. mutans* in biofilms was significantly reduced by the ethanolic extract *S. brasiliensis* (2 mg/mL) as determined by glycolytic pH-drop test in the presence of excess of glucose (Figure 2). The ethanolic extract and chlorhexidine showed statistically reduction in the production of acids when compared to the saline biofilm, in the period of 15 min to 120 min ($p < 0.05$). The final pH value at 120 min was 4.46 ± 0.23 for saline group, 6.97 ± 0.24 for the *S. brasiliensis* extract and 7.32 ± 0.19 for the chlorhexidine treatment ($p < 0.05$). The chlorhexidine and ethanolic extract biofilm showed similar reduction in the production of acids in the period of 15 min to 60 min ($p > 0.05$), and only differ at 120 min ($p < 0.05$).

The ethanolic extract of *S. brasiliensis* leaves were not able to reduce the acid tolerance of the *S. mutans* on biofilms when compared to saline group or chlorhexidine ($p < 0.05$) (Figure 3). The chlorhexidine reduced the acid tolerance from 10 min to 120 min comparing to the ethanolic extract and saline control group ($p < 0.05$). The final pH value at 120 min was 4.74 ± 0.10 for saline group and 4.91 ± 0.15 for the ethanolic extract ($p > 0.05$), and 5.64 ± 0.08 for chlorhexidine ($p < 0.05$).

4. Discussion

Caries is an infectious-contagious disease that has a chronic multifactorial pattern, being *Streptococcus mutans* a major etiological agent of dental caries.^{5,3} Considered a worldwide oral health problem that can affect people throughout life, it is given little

public health priorities in many countries.² Therefore, in an attempt to prevent and treat oral diseases, especially those bacterial biofilms, one attractive approach would be the development of new therapies based on natural products with good effectiveness and minimal aggression to the host organism.⁹ The prospection of compounds extracted from medicinal plants with antimicrobial properties has been researched with the purpose of obtaining new antimicrobial agents.³³ In our study, we analyzed the antimicrobial potential of the leaves of *S. brasiliensis* against *Streptococcus mutans* UA159.

The present study evaluated the antimicrobial activity of the *S. brasiliensis* ethanolic extract, its fractions (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) and subfractions against *S. mutans* UA159. Quantitative tests were used to evaluate the ability of the plant to inhibit bacterial growth (MIC) and cause irreversible damage to the bacterial cell (MBC). According to Holetz et al., (2002)³⁴ MIC values of crude extracts lower than 100 µg/mL indicates a good antimicrobial activity; 100 to 500 µg/mL the antimicrobial activity is moderate; 500-1000 µg/mL considers antimicrobial activity is weak, and values above 1000 µg/mL the extract is considered inactive. Considering this classification, the ethanolic extract can be classified as a good antimicrobial because had a MIC at 31.25 µg/mL. The fractions of hexane, dichloromethane and ethyl acetate also showed good bacteriostatic antimicrobial activity. The subfractions H1, H3, H4, D2, D4, A1 and A2 demonstrated good antimicrobial activity. The subfractions H2, D3 A3, D4.8 and D4.13 indicated moderate action. The subfractions D1, A4 and D4.12 showed weak antimicrobial activity. The fraction of butanol and subfraction D4.11, did not showed antimicrobial activity at the higher dose tested (1000 µg/mL). In relation to MBC, bactericidal activity was demonstrated in the ethanolic extract, hexane, dichloromethane, ethyl acetate fractions, and subfractions H2, D2, D3, D4, D4.8 A1 and A2. In the literature, there are studies that prove this activity, such as the study done with the ethanolic extract, hexane and ethyl acetate of the bark of *S. brasiliensis* in which it showed activity against planktonic cells of *S. mutans* with MIC varying between 250 and 500 µg/mL.³⁵ Another study has also pointed out good antimicrobial activity for hexane fraction of *S. brasiliensis* against planktonic cells of *S. oralis*, but not with *S. mutans*.³⁶

In our study, we evaluated the antimicrobial effect of ethanolic extract of the leaves of *S. brasiliensis* in *S. mutans* UA159 biofilm formation in tooth bovine model, evaluating viable cell count and determination of polysaccharides synthesized. The acid tolerance and acid production were also evaluated. Biofilms of *S. mutans* UA159 were

treated by ethanolic extract *S. brasiliensis* and were able to inhibit the biofilm formation as they show bactericidal effect, by reducing the viable cells on biofilm. A higher concentration of the extract was used in biofilms than in planktonic assays, concentration two hundred times higher than the MBC. It occurs because when bacterial cells are organized into biofilms, they have a higher density of biomass, which makes it harder for the extract to penetrate in biofilm, and they can survive in stressful conditions more easily than if they were in planktonic form.³⁷ Even so, the ethanolic extract of *S. brasiliensis* was able to produce death of *S. mutans*, reducing biomass (total dry weight).

S. mutans has the ability to adhere tightly to the surface of the tooth because can produce at least three types of glucosyltransferases enzymes (GTF) such GtfB, GtfC and GtfD that metabolizes sucrose in glucans, which can be soluble and insoluble in water. The formation of glucans is important virulence factors that contribute to the stability and structural integrity and the formation of dental biofilm.³⁸ GtfB synthesizes water insoluble glucans, GtfC produces a mixture of soluble and insoluble glucans, and GtfD catalyzes synthesis of water soluble glucans.³⁸ The ethanolic extract of *S. brasiliensis* were able to reduce the production of insoluble and soluble glucans in alkali in the biofilm of *S. mutans* UA159. Water insoluble glucans are the major constituents of dental biofilm matrix.³⁹ In addition, the elevated amounts of insoluble glucans in dental biofilm significantly reduced the inorganic concentration (Ca, P and F) in the matrix.³⁸ Therefore, the lower levels of this glucan or the inhibition of Gtfs activity in biofilms are important to reduce the virulence of cariogenic biofilms, with the reduction of the attachment of microorganism to the matrix, leading to the reduction of biomass formation.⁴⁰

S. mutans metabolize dietary sugars and produce organic acids such as lactic acid by the glycolysis pathway, which is a biochemical reaction that occurs in the cytoplasm.⁴¹ The pH 5.5 is the critical pH, which occurs demineralization of the tooth enamel. Thus, anticariogenic agents can promote changes in pH by inhibiting glycolysis, resulting in less production of acids to the biofilm. In the present study, the ethanolic extract of *S. brasiliensis* reduced the acid formation resulting from metabolism through the carbohydrate glycolytic pathway as observed in the pH-drop assay. The final pH of saline was almost 4.46, below the critical pH that occur the demineralization of the tooth enamel. However, the ethanolic extract showed final pH nearly 6.97 and chlorhexidine at 7.3. The ethanolic extract and chlorhexidine near completely stopped the acid production from glucose, maintained the final pH above the critical pH when occurs demineralization of

enamel. Rates of pH drop reflect acidogenic capacities of the cells, while final pH values of the suspensions also reflect acid tolerance.³² Furthermore, the ethanolic extract also sensitized the cells to acidification to the point that the final pH values were significantly higher (2.5 units) than those in the presence of vehicle control. These effects could be related, in part, to disruption of proton permeability of *S. mutans* cell membrane caused by the extract, which would affect the pH gradient (ΔpH) across the membrane, leading to inhibition of the overall intracellular metabolism, including acid production.⁴² Moreover, the extract could be also inhibiting the glycolytic enzymes directly.

The acid tolerance of *S. mutans* leads to the microorganism to survive in low pH, the intracellular pH is maintained above the extracellular pH of the dental biofilm, due to the increase of the membrane protein F-ATPase, that make the extrusion of protons. This mechanism allows the microorganism to maintain the pH of the cytoplasm most alkaline and to protect sensitive glycolytic and acidic enzymes that are present in the cell.^{43,44} The rise of pH of a suspension as protons moved into the cell was recorded with a glass pH electrode. The ethanolic extract was able to increase the dynamic proton permeability of cell membranes between 40 and 80 min in comparison to control ($p < 0.05$), and the rises of pH after the addition of butanol, demonstrate that exposure. Thus, a change in the permeability of the cell membrane may be one of the mechanisms that can affect the growth of *S. mutans*.

The compounds that are responsible for the therapeutic effects are usually the secondary metabolites.⁴⁵ In this study, the secondary metabolites classes were investigated from phytochemical analyzes. GC–MS analysis of the dichloromethane subfractions identified the major compounds: gallic acid (D2, D3, D4, D4.12 and D4.13), ethyl gallate (D2 and D4.8), and methyl gallate (D4.8). In D1 subfraction, other compounds were identified as thymol and linolenic acid. In addition, the presence of sugar (D2, D3, D4, D4.12 and D4.13) was also identified. These findings are in accordance with other study realized by Moreira (2009)⁴⁶ with the dichloromethane extract, which also isolated gallic acid and methyl gallate from the leaves of *S. brasiliensis*. Furthermore, Fernandes et al. (2015)⁴⁷ developed and validated an analytical method for the quantification of gallic acid as the chemical marker with dried extract of *S. brasiliensis*.

The antimicrobial activity of the thymol, isolated as the major compound (56.7%) from *Lippia sidoides* showed MIC at 5 mg/mL and MBC of 10 mg/mL against *S. mutans*

ss-980.⁴⁸ Thymol and a fatty acid, such as linolenic acid, was demonstrated *in vitro* bacteriostatic and bactericidal activities against *S. mutans*.⁴⁹ Thymol isolated from *Origanum vulgare* L. showed highest antimicrobial activity at 125 µg/mL against *S. mutans* ATCC 25175.⁵⁰ In our study, the D1 subfraction contains thymol (0.11%) and linolenic acid (0.10%) in low concentrations, and this may be the reason for demonstrating only bacteriostatic activity with the MIC at 500 µg/mL. In addition, biofilm formation on the surface of polystyrene plates was significantly reduced by thymol at 100 µg/mL.⁵⁰ Wherein exposure to 25 µg/mL of thymol showed an increase in Autolysin gene (*AtlE*) expression level that induces apoptosis-like activity, increased the expression level of *sodA* genes that demonstrate an increase in oxidative stress and general stress in *S. mutans*, and a decrease in the *gtfB* gene expression levels that suggests the inhibition of insoluble glucans production and biofilm formation.⁵⁰ Thymol present in the ethanol extract of *S. brasiliensis* can contribute to the reduction of the production of insoluble glucans in the formation of biofilm by reducing the expression of *gtfB*.

The methyl gallate (MG) and gallic acid (GA) are phenolic compounds with pharmacological activities already demonstrated, including antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities, which can inhibit the growth of cariogenic bacteria *in vitro*, as well, the formation of *S. mutans* biofilms.⁵¹ MIC of GA isolated from black tea leaves against *S. mutans* was 2 mg/mL.⁵² Shao et al. (2015)⁵³ obtained MIC of GA at 8 mg/mL for *S. mutans*, and the inhibition effect of GA on biofilm could be due to other factors in additional to the antibacterial effect: nutrient level, treatment temperature and incubation time affect the inhibition activity of GA.⁵³ Kang et al. (2008)⁵¹ examined the ability of MG and GA in *Galla rhois*, and both had inhibitory effects on the growth of *S. mutans* and *S. sobrinus* (MIC < 8 mg/ml). Moreover, at 4 mg/ml both MG and GA significantly inhibited the formation of the artificial *S. mutans* biofilms, by 79.0% and 69.2%, respectively. Anti-adhesion might be one mechanism in action in antimicrobial activity of MG and GA, the adherence of *S. mutans* was inhibited by MG (1~4 mg/ml) and GA (2~4 mg/ml). In our study, it was observed the presence of gallic acid in D2 (2.79%), D3 (13.68%), D4 (12.32%), D4.12 (12.24%) and D4.13 (3.70%) subfractions that showed low MIC values between 31.25 and 1000 µg/mL. In the D2 subfraction, there is also ethyl gallate (EG – 49.7%) working in synergism with GA to show antimicrobial activity (MIC 62.5 µg/mL). 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.⁵⁴ Mechanisms of action might be inhibition of extracellular microbial enzymes required for microbial growth or direct action on microbial metabolism through inhibition of oxidative phosphorylation.⁵¹ Thus, there is no clear consensus about its antimicrobial mechanisms of gallic acid. The study performed by Borges et al. (2013)⁵⁵ observed that the phenolic acids, in particular gallic acid, changed significantly the cell surface of bacterial, changing the bacterial hydrophobicity. Furthermore, Zhang et al. (2015)⁵⁶ reported that GA has been shown to inhibit enamel demineralization and enhance remineralization, and the inhibition effect is not influenced by pH, indicating that GA could be used at a wide pH range.

The D4.8 subfraction contains methyl gallate (MG - 45.68%) and ethyl gallate (54.32%) and showed a lower MIC at 125 µg/mL, which results may be associated with the synergism, between these two compounds. Kacergius et al. (2017)⁵⁷ demonstrated that the MG reduced the *S. mutans* UA159 biofilm biomass grown for 24 h on the polystyrene surface in a dose-dependent manner, exhibiting its highest effect at concentrations of 1 mg/mL, with biofilm inhibition at 93%. Kang et al. (2008)⁵¹ demonstrated using beaker-wire tests that 1 mg/mL of MG significantly reduced the wet weight biofilm biomass of *S. mutans* (strain Ingbritt) in comparison with untreated bacteria, after 24 h of incubation in medium containing 5% sucrose. In our study, the D4.8 subfraction have 45.68 % of MG and showed good bacteriostatic (MIC 125 µg/mL) and bactericidal (MBC 250 µg/mL) activities, contributing to the reduction of biofilm biomass by the ethanolic extract. Kacergius et al. (2017)⁵⁷ also showed that treatment of *S. mutans* bacteria with the isolated MG significantly prevented a decrease in the pH level, compared with untreated bacteria grown in THB with 1% sucrose. This preventive effect of MG occurred in a dose-dependent manner, and MG concentrations from 0.7 to 1 mg/ml increased pH by 96-97%. It may be hypothesized that the antibiofilm effect is because of the downregulation of glucosyltransferases and the inhibition of F-ATPases in *S. mutans*.⁵⁷ Choi et al. (2014)⁵⁸ indicates that the primary mechanism of MG action is via DNA gyrase or ATPase inhibition in the *Salmonella*, but not via cell wall synthesis inhibition. The proton permeability of *S. mutans* was increased in our study when the 5 days biofilm was treated with the ethanolic extract of the leaves of *S. brasiliensis*.

Antibacterial activity of ethyl gallate (EG) isolated from *Pistacia integerrima* Linn was evaluated against *S. mutans* UA159, MIC and MBC were 1.56 and 6.25 mg/mL,

respectively.⁵⁹ In our study, the ethyl gallate is present in D2 and D4.8 subfractions, with 49.7% and 54.32% respectively, and showed bacteriostatic (MIC 62.5 and 125 µg/mL, respectively) and bactericidal (MBC 250 and 500 µg/mL, respectively) activities. Thus, the MIC/MBC values found in our study were lower than the concentration found by Gabe et al. (2019)⁵⁹ probably because of the synergism with GA in D2 subfraction and with MG in D4.8 subfraction. These authors also observed that highest concentration of EG 0.7 mg/mL (3.53 mM) reduced *S. mutans* biofilm formation on polystyrene (68%) and glass (91%) surfaces, and prevented a decrease in pH levels occurred in a dose-dependent manner, and EG concentrations from 3.38 to 3.53 mM increased the pH by 95–96%. In our study, the antimicrobial activity in biofilm occur with concentration at 50 mg/mL of the crude ethanolic extract, a higher concentration than used by these authors. Furthermore, the alteration of acid productions by *S. mutans* in biofilms were obtained with the concentration of 25 mg/mL of ethanolic extract, probably because of the lower amount of these active compounds (MG, GA and EG) in the crude extract. The expression of genes encoding glucan binding protein B (*gbpB*), glucosyltranferases B, -C, -D (*gtfB*, -C, -D), and F-type ATPases (*atpD*) were also evaluated using a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). Biofilm-producing bacteria treated with EG underwent significant gene expression changes for three genes — *gtfC*, *gtfB*, and *gbpB* — with 98.6, 47.5, and 13.8 increases in fold change, respectively, which synthetize water-insoluble glucans with α-1.3-glucosidic linkages and glucan-binding proteins (Gbp proteins)⁵⁹. In our study, the production of insoluble glucans was reduced in biofilm of *S. mutans* treated by ethanolic extract, probably by reducing the *gtfC* and *gtfB* gene expressions. The expression of *gtfD*, which synthesizes water-soluble glucans rich in α-1,6-glucosidic linkages was not altered, and in our study, the production of soluble glucans was also not altered. The F0F1-H/F-ATPase β subunit of the F1 protein, which is encoded by the *atpD* gene of *S. mutans*, has a lower optimal pH than that of many other oral microbes and is significantly upregulated during growth under acidic conditions that gives *S. mutans* a significant competitive advantage over other species under acidic conditions, contributing to the relative aciduricity of the organism. The EG treatments did not produce any significant expression change in *atpD* gene in comparison with the control. Although, in our proton permeability test, the extract was able to reduce the aciduric capacity of *S. mutans*, probably because the synergism of various active compounds thymol presents on the ethanolic extract that changed the permeability of the *S. mutans* membrane.

Thus, the ethanolic extract proved to be promising in inhibiting the formation of the *S. mutans* cariogenic dental biofilm, due to its antimicrobial activity and inhibition of insoluble glucan production, decreasing acidogenicity and aciduricity of bacteria. The effective concentrations tested of 25 and 50 mg/mL are much higher than those tested with the isolated compounds described in previously studies of others authors. This may have occurred because the crude extract is composed of a variety of active compounds, and the minor components may contribute to an antagonistic or synergistic effect on the activity of the ethanolic extract, and generally, the active compounds are in lower concentrations in the crude extract than when the compound is tested alone. In addition, our biofilm was grown for 5 days, having a higher biomass and complexity than biofilms with 24h growth, hindering the penetration and action in the biofilm. The extracts, fractions and subfractions of the leaves of *S. brasiliensis* tested with sub-MIC concentrations did not inhibit the adherence of *S. mutans*, possibly due to the lowest concentration of extracts tested. Thymol and ethyl gallate probably are the compound that affect the *gtfB* expression that affect the production of insoluble glucans in the biofilm formation. Methyl gallate and gallic acid can be affect the proton permeability of the *S. mutans* membrane, reducing the aciduricity of bacteria.

5. Conclusion

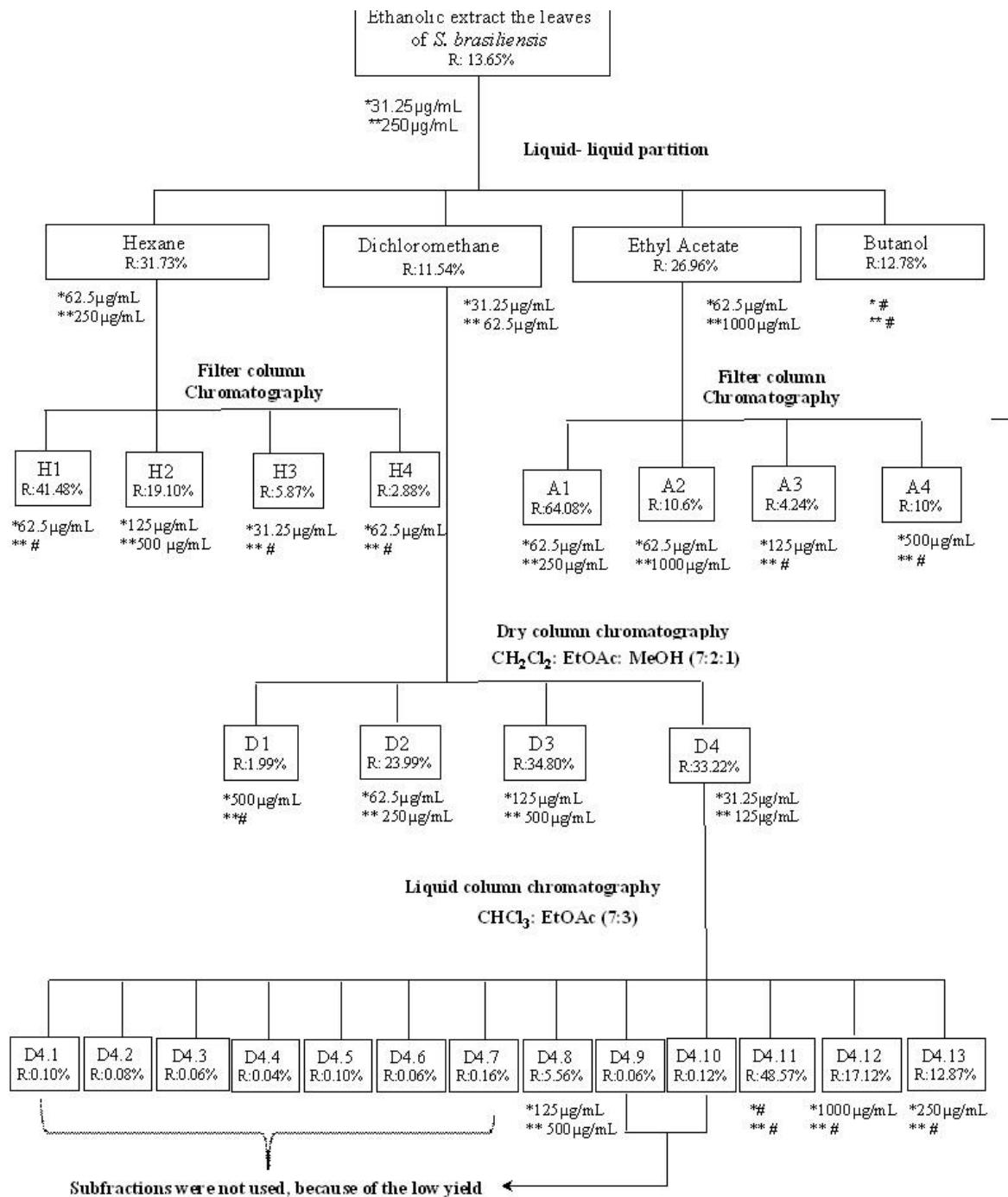
The ethanolic extract, fractions and subfractions (A1–A4, H1–H4, D1–D4, D4.8, D4.12 and D4.13) of the leaves of *Schinopsis brasiliensis* presented great antimicrobial activity against *S. mutans* UA159 in planktonic cells. Furthermore, the ethanolic extract was able to inhibited the 5 days biofilm formation, by reducing the dry weight of biomass, insoluble and alkaline soluble glucans production. Furthermore, Ethanolic extract also reduced the acidogenicity and aciduricity of *S. mutans* UA159 in biofilms. The active compounds isolated in the subfractions of dichloromethane as thymol, gallic acid, ethyl gallate, and methyl gallate must be the main responsible for the activities of the ethanolic extract on the biofilm of *S. mutans*. Thus, ethanolic extract and its compounds are promising in the development of new pharmaceuticals and formulations of natural products with anti-biofilm activities for oral health. More studies will be conducted in the future to elucidate the antimicrobial compounds in the other fractions of the ethanolic extract, and to elucidate the mechanisms of action of these compounds against *S. 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 bioguided fractionation of the extracts of *S. brasiliensis* leaves.



The hexane (H), dichloromethane (D), ethyl acetate (A), butanol and subfractions (H, D and A). (*) MIC; (**) MBC; R: yield; (#) Not showed antimicrobial activity at the highest concentrations tested.

Table 1. Thin Layer Chromatography with phytochemical profiles to assess the presence of flavonoids, alkaloids and steroids of Ethanolic extract, fractions, subfractions of the leaves of *Schinopsis brasiliensis*.

<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler Extract/ fraction / subfractions	Phytochemical profiles		
	Flavonoids	Alkaloids	Steroids
Ethanolic extract	+	-	+
Dichloromethane	+	-	+
Subfraction D1	-	-	-
Subfraction D2	+	-	-
Subfraction D3	+	-	+
Subfraction D4	+	-	+
Subfraction D4.8	+	-	-
Subfraction D4.12	+	-	+
Subfraction D4.13	+	-	-

(+) Presence, (-) Absence

Table 2. Chemical constituents identified in subfractions D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12, D4.13 from the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler.

tr	Substance	% relative área						
		D1	D2	D3	D4	D4.8	D4.12	D4.13
5024	3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane	-	-	0.60	0.25	-	-	-
6940	Lactic acid	3.54	-	0.86	0.61	-	0.36	3.01
7426	Acetic acid	-	-	-	-	-	-	0.65
9500	Oxalic acid	-	-	-	-	-	-	0.21
9826	3-hydroxypropionic acid	-	-	-	-	-	-	0.47
14726	Glycerol	87.89	17.37	18.98	14.90	-	35.07	4.10
15644	Thymol	0.11	-	-	-	-	-	-
15809	Succinic acid	-	-	-	-	-	-	0.28
16631	Glyceric acid	-	-	0.24	-	-	-	2.50
18130	Butane-1,3-diol	-	-	0.83	0.53	-	-	-
21689	Sugar	-	-	-	0.82	-	-	-
21764	Sugar	-	-	0.34	0.49	-	-	-
22101	Salicylic acid	0.40	0.48	-	-	-	-	-
22529	Sugar	-	-	-	-	-	0.48	-
22541	Pyroglutamic acid	-	-	-	-	-	-	0.45
23608	Sugar	-	-	-	-	-	-	1.09
24170	Sugar	-	-	0.52	0.92	-	-	4.86
24870	Sugar	-	-	0.15	-	-	-	-
25965	Sugar	-	-	-	-	-	-	0.44
26083	Dodecanoic acid	1.10	-	-	-	-	-	-
28680	Sugar	-	-	-	-	-	0.38	-
29776	2,3-dihydroxypropyl phosphoric acid	-	-	-	-	-	-	0.48
29862	Sugar	-	-	-	-	-	-	1.82
33084	Sugar	-	-	-	-	-	-	0.41
30114	Sugar	-	-	-	-	-	-	0.50
30321	Sugar	-	-	-	-	-	1.57	2.38
30825	Protocatechuic acid	-	1.12	-	-	-	-	-
30924	3,4,5 trihydroxycyclohexene-1carboxylic acid	-	-	2.16	3.68	-	-	16.97
31169	Sugar	-	-	-	0.82	-	2.90	-
31286	Tetradecanoic acid	0.29	-	-	-	-	0.66	-
32075	Homomenthyl salicylate	0.11	-	-	-	-	-	-
32888	Methyl gallate	-	-	-	-	45.68	-	-
33069	Sugar	-	-	-	-	-	4.05	-
33925	Hexadecanol	0,06	-	-	-	-	-	-
34001	Ethyl hexadecanoate	0,33	-	-	-	-	-	-

34039	Ethyl gallate	-	49.7	-	-	54.32	-	-
34262	Sugar	-	-	1.42	1.93	-	3.68	-
34428	Gallic acid	-	2.79	13.68	12.32	-	12.24	3.70
34824	Hexadecanoic acid	0.51	-	-	-	-	-	-
35407	Sugar	-	-	-	0.60	-	2.01	0.67
36041	Octadecanol	1.71	-	-	-	-	-	-
39600	Linolenic acid	0.10	-	-	-	-	-	-
39889	Hexanedioic acid	0.25	-	-	-	-	-	-
40058	Sugar	-	-	-	-	-	0.86	-
42811	Sugar	-	-	-	0.63	-	1.51	1.86

t_R = Rentention time

Table 3. Values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) of the Ethanolic extract, fractions and subfractions of the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler against *Streptococcus mutans* UA159.

<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Antimicrobial activity against <i>Streptococcus mutans</i> UA159		
	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MICA (μ g/mL)
Ethanolic extract	31,25	250	#
Hexane	62,5	250	#
Dichloromethane	31,25	62,5	#
Ethyl Acetate	62,5	1000	#
Butanol	#	#	#
Subfraction H1	62,5	#	#
Subfraction H2	125	500	#
Subfraction H3	31,25	#	#
Subfraction H4	62,5	#	#
Subfraction D1	500	#	#
Subfraction D2	62,5	250	#
Subfraction D3	125	500	#
Subfraction D4	31,25	125	#
Subfraction D4.8	125	500	#
Subfraction D4.11	#	#	#
Subfraction D4.12	1000	#	#
Subfraction D4.13	250	#	#
Subfraction A1	62,5	250	#
Subfraction A2	62,5	1000	#
Subfraction A3	125	#	#
Subfraction A4	500	#	#

MIC, MBC and MICA values are expressed in μ g/mL. The concentrations ranged from 31.25 to 1000 μ g/mL for Ethanolic extract, fractions and subfractions of *Schinopsis brasiliensis* Engler. # Not showed antimicrobial and antiadherence activity at the highest concentrations tested.

Table 4. Effects of ethanolic extract of the leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler on viability of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.

Treatments	CFU/biofilm
Saline	$7.39 \times 10^6 \pm 4.43 \times 10^6$ ^a
Chlorhexidine 0.12%	$6.9 \times 10^1 \pm 1.40 \times 10^1$ ^b
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	$1.54 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^4$ ^b

*Values in the same column followed by equal letters are statistically the same ($p > 0.05$). Statistical analysis was performed between saline, chlorhexidine 0.12% and ethanolic extract of *Schinopsis brasiliensis* (50 mg/mL), by One Way ANOVA, followed by Dunn's Multiple Comparing test ($n = 22$).

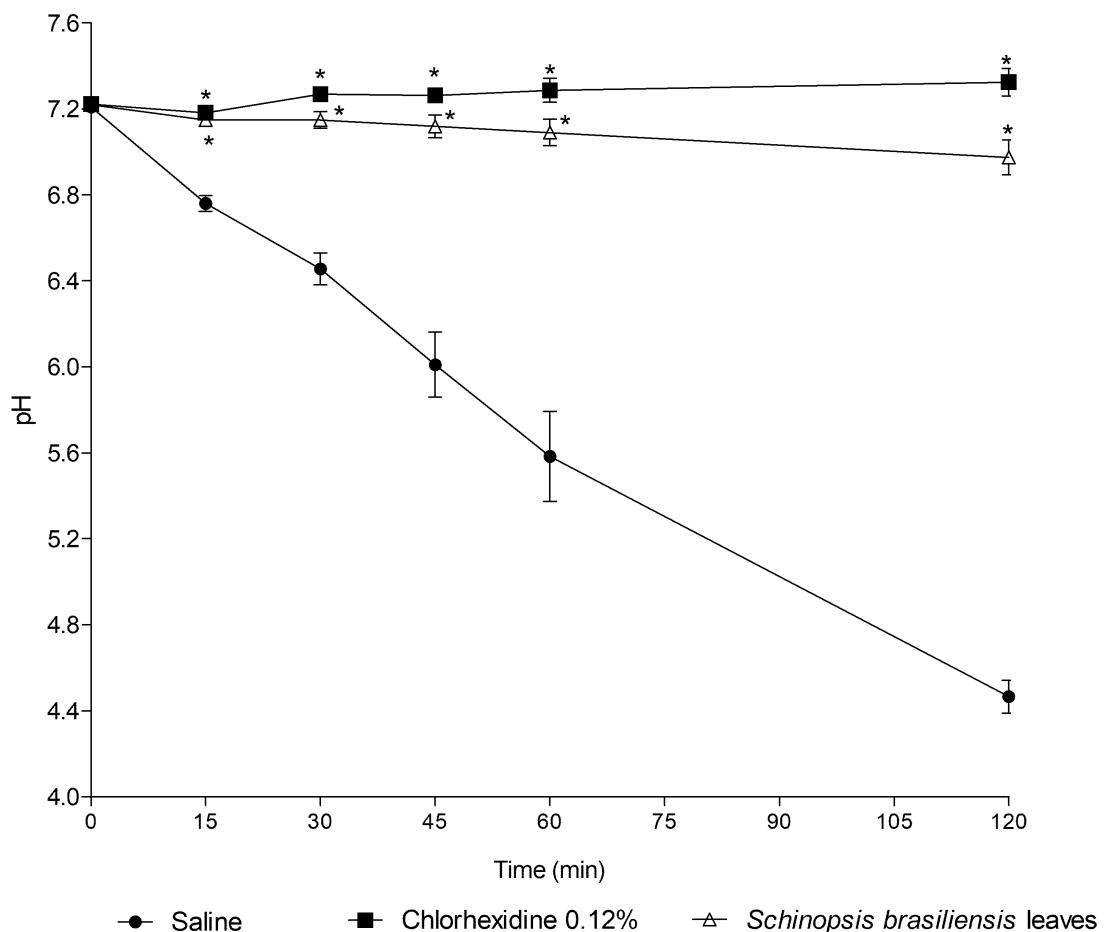
Table 5. Effects of the ethanolic extract of the leaves of *Schinopsis brasiliensis* on the composition of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.

Treatments	Dry weight Biofilm (mg)	Soluble glucans in alkali mg/biofilm	Soluble glucans mg/biofilm	Insoluble glucans mg/biofilm
Saline	36.15±8.60 ^a	37.58±8.17 ^a	0.69±0.04 ^a	28.87 ±6.97 ^a
Chlorhexidine 0.12%	8.15±4.98 ^b	5.75±1.89 ^b	0.42±0.03 ^b	15.32± 8.36 ^b
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	28.64 ±10.17 ^c	33.01±5.49 ^c	0.68±0.04 ^a	24.67 ±4.90 ^c

*Values in the same column followed by equal letters are statistically the same ($p > 0.05$).

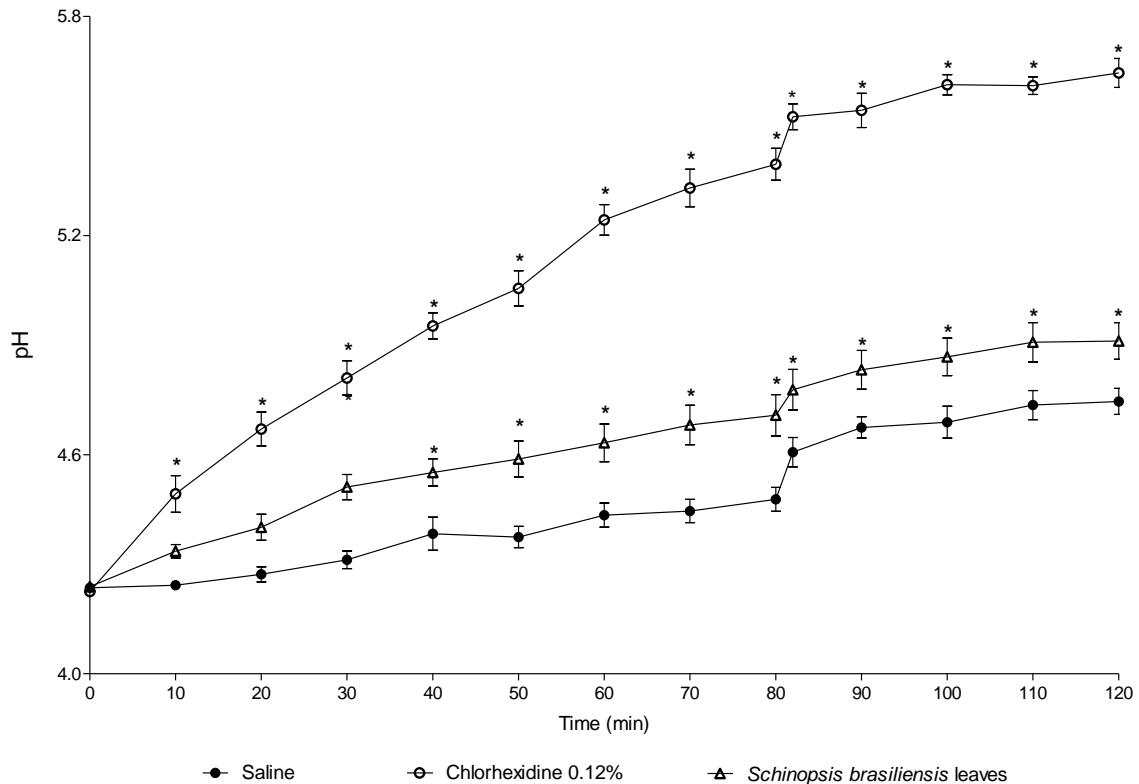
Statistical analysis was performed between saline, chlorhexidine 0.12% and ethanolic extract of *Schinopsis brasiliensis* (50 mg/mL), by One Way ANOVA, followed by Dunn's Multiple Comparing test.

Figure 2. Influence of ethanolic extract the *Schinopsis brasiliensis* Engler leaves on glycolytic pH-drop in *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.



* Statistical difference was found among the treatments with Chlorhexidine 0.12% and ethanolic extract *Schinopsis brasiliensis* leaves compared to saline treatment ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed by TWO-WAY ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ($n = 22$).

Figure 3. Influence of ethanolic extract from leaves of *Schinopsis brasiliensis* Engler on proton permeability's of *Streptococcus mutans* UA159 in biofilms.



* Statistical difference was found among the treatments with Chlorhexidine 0.12% and ethanolic extract *Schinopsis brasiliensis* Engler leaves compared to saline treatment ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed by TWO-WAY ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test ($n = 22$).

References

- (1) Kassebaum, N. ; Smith, A. G. C.; Bernabé, E.; Fleming, T. D.; Reynolds, A. ; Vos, T.; Murray, C. J. ; Marçenes, W.; Collaborators, G. 2015 O. H. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J. Dent. Res.* **2017**, *96*, 380–387.
- (2) Pitts, N.; Zero, D. White Paper on Dental Caries Prevention and Management. *Fdi* **2012**, *1*–59.
- (3) Hamada, S.; Slade, H. D. Biology, Immunology, and Cariogenicity of Streptococcus Mutans. *Microbiol. Rev.* **1980**, *44*, 331–384.
- (4) Matsui, R.; Cvitkovitch, D. NIH Public Access. *Futur. Microbiol* **2011**, *5*, 403–417.
- (5) Leite, A. C. B. R.; Pinto, M. B.; Sousa, E. R. de. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita* **2006**, *85*, 295–300.
- (6) Chen, Y.; Angello, M.; Dinis, M.; Chien, K. C.; Wang, J.; Hu, W.; Shi, W.; He, X.; Zou, J. Lollipop Containing Glycyrrhiza Uralensis Extract Reduces Streptococcus Mutans Colonization and Maintains Oral Microbial Diversity in Chinese Preschool Children. *PLoS One* **2019**, *1*–14.
- (7) Berger, D.; Rakhamimova, A.; Pollack, A.; Loewy, Z. Oral Biofilms : Development , Control , and Analysis. *High-Throughput* **2018**, *24*, 1–8.
- (8) Michael, C. A.; Dominey-howes, D.; Labbate, M. The Antimicrobial Resistance Crisis : Causes, Consequences , and Management. *Front. public Heal.* **2014**, *2*, 1–8.
- (9) 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*.
- (10) Valli, M.; Russo, H. M.; Bolzani, V. S. The Potential Contribution of the Natural Products from Brazilian Biodiversity to Bioeconomy. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* **2018**, *90*, 763–778.
- (11) Carvalho, P. E. R. Braúna-Do-Sertão Schinopsis Brasiliensis. *Circ. Técnica - Empres. Brasileira Pesqui. Agropecuária* **2009**, No. 222, 1–9.
- (12) Chaves, T. P.; Coelho, I.; Delcio, D.; Felismino, D. C.; Vania, K. Atividade Antimicrobiana Das Folhas de Schinopsis Brasiliensis Engler. *Rev. Biol. e Farmácia* **2011**, *5*, 11–17.
- (13) Albuquerque, U. P. de; Soldati, G. T.; Sieber, S. S.; Medeiros, P. M. de; Sá, J. C. de; Souza, L. C. de. Rapid Ethnobotanical Diagnosis of the Fulni-ô Indigenous Lands (NE Brazil): Floristic Survey and Local Conservation Priorities for Medicinal Plants. *Env. Dev Sustain* **2011**, *13*, 277–292.

- (14) Silva, A. C. da; Albuquerque, U. P. De. Woody Medicinal Plants of the Caatinga in the State of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta bot. bras.* **2005**, *19*, 17–26.
- (15) Albuquerque, U. P. De; Oliveira, R. F. De. Is the Use-Impact on Native Caatinga Species in Brazil Reduced by the High Species Richness of Medicinal Plants? *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 156–170.
- (16) Almeida, C. de F. C. B. R. de; Ramos, M. A.; Amorim, E. L. C. de; Albuquerque, U. P. de. A Comparison of Knowledge about Medicinal Plants for Three Rural Communities in the Semi-Arid Region of Northeast of Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **J.** **2010**, *127*, 674–684.
- (17) Silva, P.; Brand, D. O.; Chaves, T. P.; Filho, A. L. N. F.; Costa, E. M. M. D. B.; Santos, V. L.; Cl, A.; Medeiros, D. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast : Contribution to the Control of Oral Microorganisms. **2012**, *2012*.
- (18) Saraiva, A. .; Saraiva, C. .; Cordeiro, R. .; Soares, R. .; Xavier, H. .; Caetano, N. Atividade Antimicrobiana E Sinérgica Das Frações Das Folhas de Schinopsis Brasiliensis Engl . Frente a Clones Multirresistentes de Staphylococcus Aureus. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2013**, *15*, 199–207.
- (19) Saraiva, A. M.; Castro, R. H. A.; Cordeiro, R. P.; Peixoto, T. J. S.; Castro, V. T. N. A.; Amorim, E. L. C.; Xavier, H. S.; Maria, N. C. In Vitro Evaluation of Antioxidant , Antimicrobial and Toxicity Properties of Extracts of Schinopsis Brasiliensis Engl. (Anacardiaceae). *African J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *5*, 1724–1731.
- (20) Chaves, T. P.; Barbosa, A. S.; Nunes, L. E.; Monik, K.; Silva, A.; Oliveira, M.; Santos, R. L.; Mayer, R.; Catão, R.; Santos, V. L.; Cláudia, A.; Medeiros, D. Evaluation of the Potential Modulator of Bacterial Resistance , Acute Toxicity and Chemical Composition of Schinopsis Brasiliensis Engl . *African J. P* **2015**, *9*, 843–849.
- (21) Cechinel Filho, V.; Schlemper, V.; Santos, A. R. S.; Pinheiro, T. R.; Yunes, R. A.; Mendes, G. L.; Calixto, J. B.; Delle Monache, F. Isolation and Identification of Active Compounds from Drimys Winteri Barks. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *62*, 223–227.
- (22) Yatsuda, R.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Murata, R. M.; Rehder, V. L. G.; Melo, L. V.; Koo, H. Effects of Mikania Genus Plants on Growth and Cell Adherence of Mutans Streptococci. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 183–189.
- (23) Nascimento, G. C.; Menezes, A. C. S.; Elizangela, P. Identificação Do Flavonóide 7,4'-Dimetoxi-Quercentina- 3-O-B-D-Glicopiranosídeo E Avaliação Da Atividade Antitumoral Dos Frutos. *Rev. Process. Químicos* **2011**, *5*, 44–55.
- (24) Rego, E. A. Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. *Universidade dos Açores Departamento De Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento*, **2012**, *101*.
- (25) Costa, A. F. Farmacognosia experimental. *Lisboa: Fundação Calouste*, **2001**, 992.

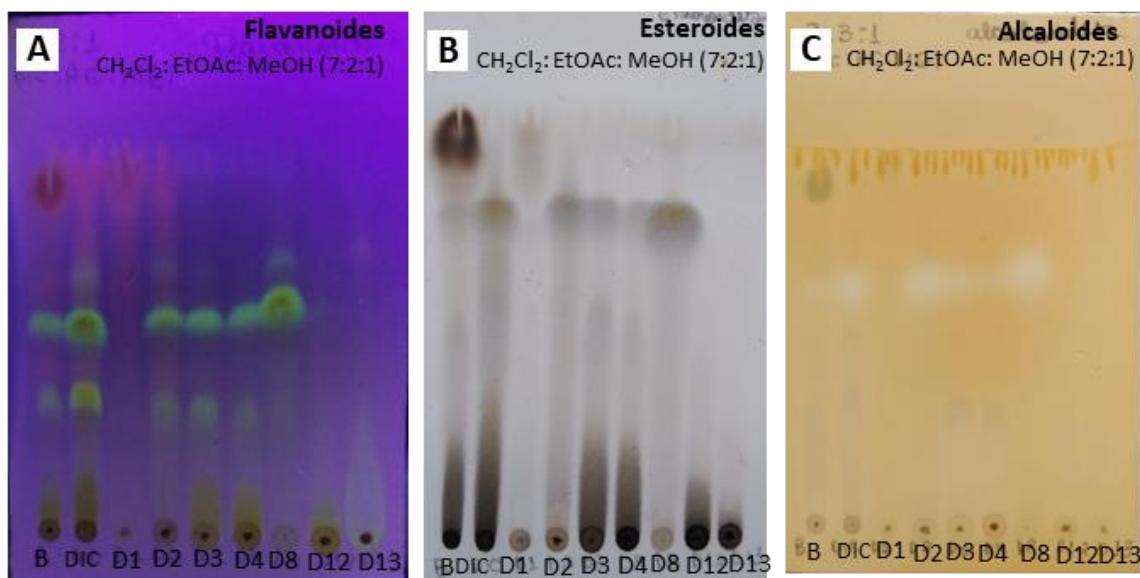
- (26) Cruz, M. P.; Andrade, C. M. F.; Silva, K. O.; De Souza, E. P.; Yatsuda, R.; Marques, L. M.; David, J. P.; David, J. M.; Napimoga, M. H.; Clemente-Napimoga, J. T. Antinoceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). *PLoS One* **2016**, *1*, 1–29.
- (27) Rodrigues, J. Z. de S.; Passos, M. R.; Neres, N. S. de M.; Almeida, R. S.; Pita, L. S.; Santos, I. A.; Silveira, P. H. S.; Reis, M. M.; Santos, I. P.; Ricardo, L. de O. N.; Lima, B. O.; Marinho, P. D. F.; Soares, A. B.; Andrade, L. O. S. B.; Pessoa, S. M. B.; Silva, M. M. L.; Oliveira, M. C.; Silva, J. P. da; Moura, M. A.; Cruz, M. P.; Marques, L. M.; Santos, T. T.; Pires, P. N.; Dias, J. C. T.; Rezende, R. P.; Uetanabaro, A. P. T.; Yatsuda, R. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus Fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus Mutans* UA159. *Microb. Pathog.* **2020**, 104063.
- (28) Palomino, J.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720–2722.
- (29) 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.
- (30) Duarte, S.; Koo, H.; Bowen, H.; Hayacibara, F.; Cury, J. A.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of *Mutans Streptococci*. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 527–531.
- (31) Belli, W., Buckley, D. H. and Marquis, R. E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Canadian journal of microbiology*. **1995**, *41*, 785-791.
- (32) Phan, T.-N.; Buckner, T.; Sheng, J.; Baldeck, J.; Marquis, R. Physiologic Actions of Zinc Related to Inhibition of Acid and Alkali Production by Oral *Streptococci* in Suspensions and Biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* **2004**, *12*, 31–38.
- (33) Botelho, M. A.; Nogueira, N. A. P.; Bastos, G. M.; Fonseca, S. G. C.; Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S.; Brito, G. A. C. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Lippia Sidoides*, Carvacrol and Thymol against Oral Pathogens. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 349–356.
- (34) Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, A. G.; Nakamura, C. V.; Prado, B.; Filho, D. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2002**, *97*, 1027–1031.
- (35) Souza, P. H. S. de. Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos. *Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGO- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.* **2015**, 132

- (36) Silva, M. S. P.; Brando, D. O.; Chaves, T. P.; Formiga Filho, A. L. N.; Costa, E. M. M. D. B.; Santos, V. L.; Medeiros, A. C. D. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semi-arid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012*, 6.
- (37) Marsh, P. D. Dental Plaque: Biological Significance of a Biofilm and Community Life-Style. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, *32*, 7–15.
- (38) Bowen, W. H.; Koo, H. Biology of Streptococcus Mutans- Derived Glucosyltransferases : Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Res.* **2011**, *45*, 69–86.
- (39) 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.
- (40) 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.
- (41) Kawada-matsuo, M.; Oogai, Y.; Komatsuzawa, H. Sugar Allocation to Metabolic Pathways Is Tightly Regulated and Affects the Virulence of Streptococcus Mutans. *Gene* **2017**, *8*, 11.
- (42) 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.
- (43) Sturr, M. G.; Marquis, R. E. Comparative Acid Tolerances and Inhibitor Sensitivities of Isolated F- ATPases of Oral Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2287–2291.
- (44) Kuhnert, W. L.; Zheng, G.; Faustoferri, R. C.; Quivey, R. G. The F-ATPase Operon Promoter of Streptococcus Mutans Is Transcriptionally Regulated in Response to External pH. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 8524–8528.
- (45) Wink, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines* **2015**, *2*, 251–286.
- (46) Moreira, B. O. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante dos Extratos Hexânico e Diclorometânicos das Folhas de Schinopsis brasiliensis Engl. (Anacardiaceae). *Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pósgraduação em Química, Universidade Federal da Bahia.* **2009**.
- (47) Fernandes, F. H. A.; Batista, R. S. D. A.; Medeiros, F. D. De; Santos, F. S.; Medeiros, A. C. D. Development of a Rapid and Simple HPLC-UV Method for Determination of Gallic Acid in Schinopsis Brasiliensis. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25*, 208–211.

- (48) Botelho, M. A.; Nogueira, N. A. P.; Bastos, G. M.; Fonseca, S. G. C.; Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S.; Brito, G. A. C. Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Lippia Sidoides*, Carvacrol and Thymol against Oral Pathogens. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40* (3), 349–356.
- (49) Huang, C. B.; George, B.; Ebersole, J. L. Antimicrobial Activity of N-6 , N-7 and N-9 Fatty Acids and Their Esters for Oral Microorganisms. *Arch. Oral Biol.* **2010**, *55*, 555–560.
- (50) Khan, S. T.; Khan, M.; Ahmad, J.; Wahab, R.; Elkader, O. H. A.; Musarrat, J.; Alkhathlan, H. Z.; Kedhairy, A. A. Al. Thymol and Carvacrol Induce Autolysis , Stress , Growth Inhibition and Reduce the Biofilm Formation by *Streptococcus Mutans*. *AMB Express* **2017**, *7*, 49.
- (51) 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.
- (52) 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.
- (53) 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.
- (54) 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.
- (55) Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M. J.; Simões, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic. *Microb. Drug Resist.* **2013**, *19*, 256–265.
- (56) 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.
- (57) 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.
- (58) Choi, J.; Mun, S.; Chahar, H. S.; Bharaj, P.; Kang, O.; Kim, S.; Shin, D.; Kwon, D. Methyl Gallate from *Galla Rhois* Successfully Controls Clinical Isolates of *Salmonella* Infection in Both In Vitro and In Vivo Systems. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–7.
- (59) Gabe, V.; Kacergius, T.; Abu-Lafi, S.; Kalesinskas, P.; Masalha, M.; Falah, M.; Abu-Farich, B.; Melninkaitis, A.; Zeidan, M.; Rayan, A. Inhibitory Effects of Ethyl Gallate on *Streptococcus Mutans* Biofilm Formation by Optical Profilometry and Gene Expression Analysis. *Molecules* **2019**, *24*, 529.

ANEXO A

Resultado das análises fitoquímicas preliminares do extrato etanólico, fração de diclorometano e subfrações das folhas de *S. brasiliensis*. Os flavonoides (A) foram identificados pela presença de spots verdes fluorescentes sob luz UV 365 nm. Os esteroides (B) foram observados spots roxos, no extrato etanólico, fração diclorometano, subfrações D3, D4 e D4.12. Não foi observado a presença de spots castanho-avermelhado para identificar os alcaloides (C). Nota: (B) extrato etanólico; (DIC) fração diclorometano; (D1, D2, D3 e D4, D4.8, D4.12 e D4.13) subfrações originadas da fração de diclorometano por cromatografia em coluna seca e líquida.



ANEXO B

Cromatogramas obtidos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa das subfrações D1, D2, D3, D4, D4.8, D4.12 e D4.13 de diclorometano da folha de *S. brasiliensis*.

Figura 1 – Subfração D1

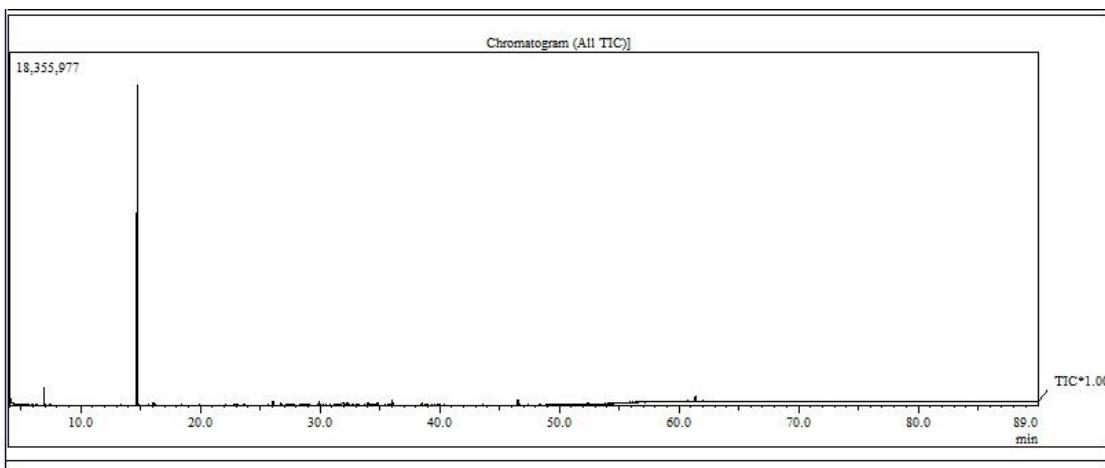


Figura 2 – Subfração D2

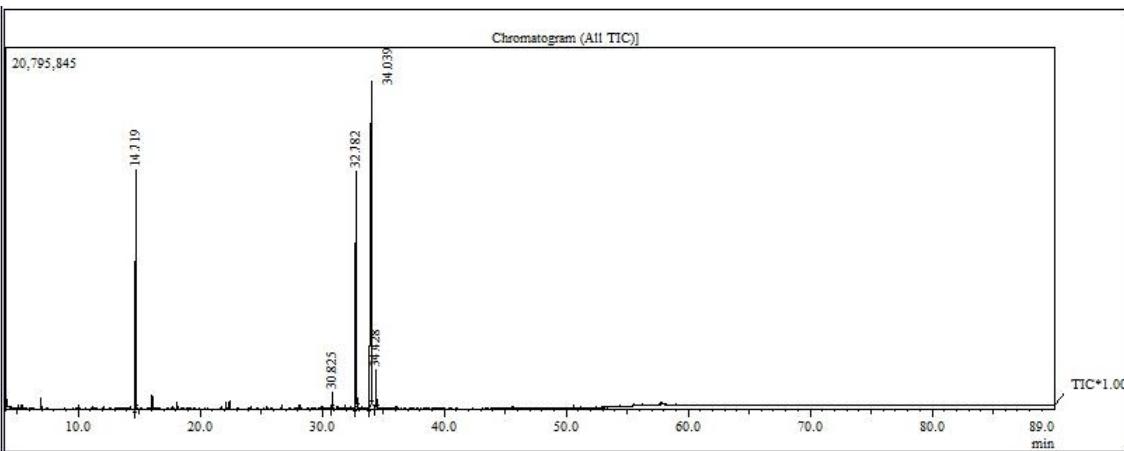


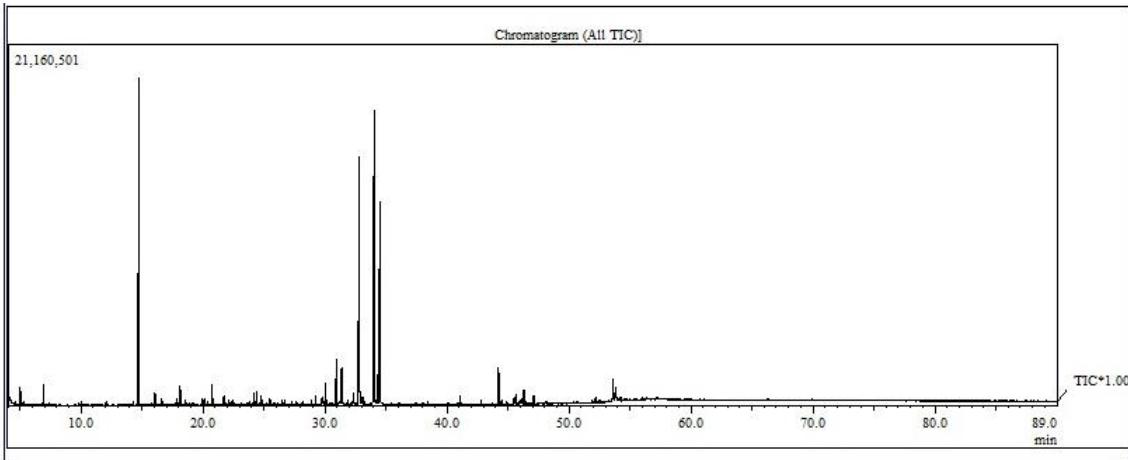
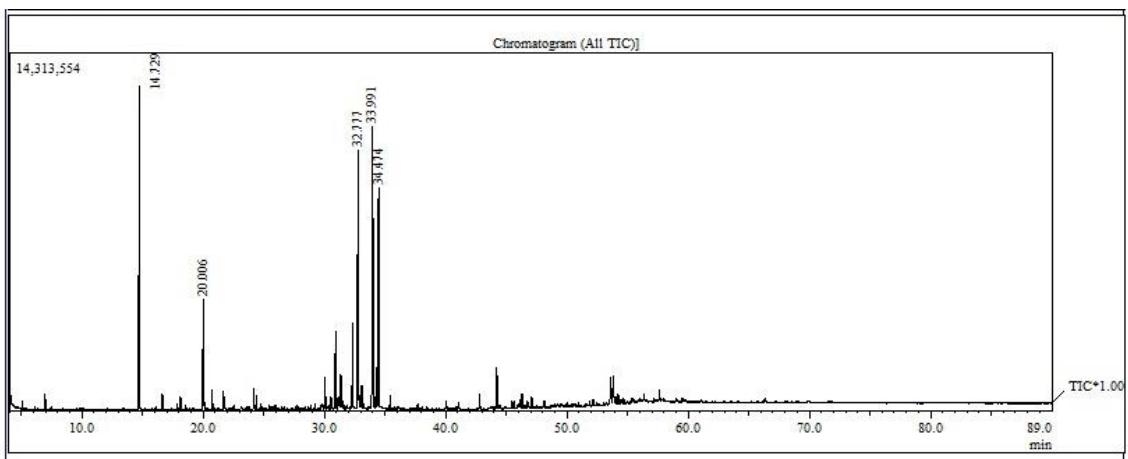
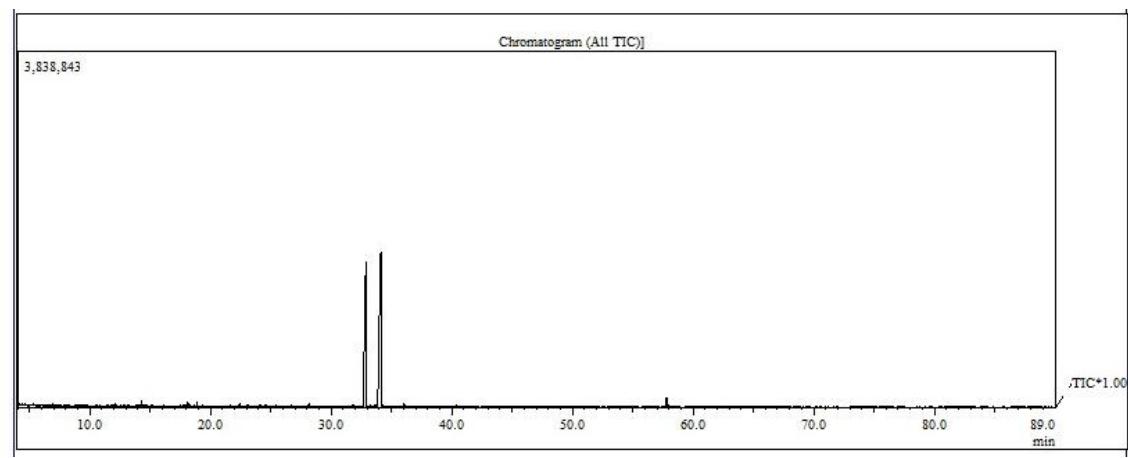
Figura 3 – Subfração D3**Figura 4 – Subfração D4****Figura 5 – Subfração D4.8**

Figura 6 - Subfração D4.12

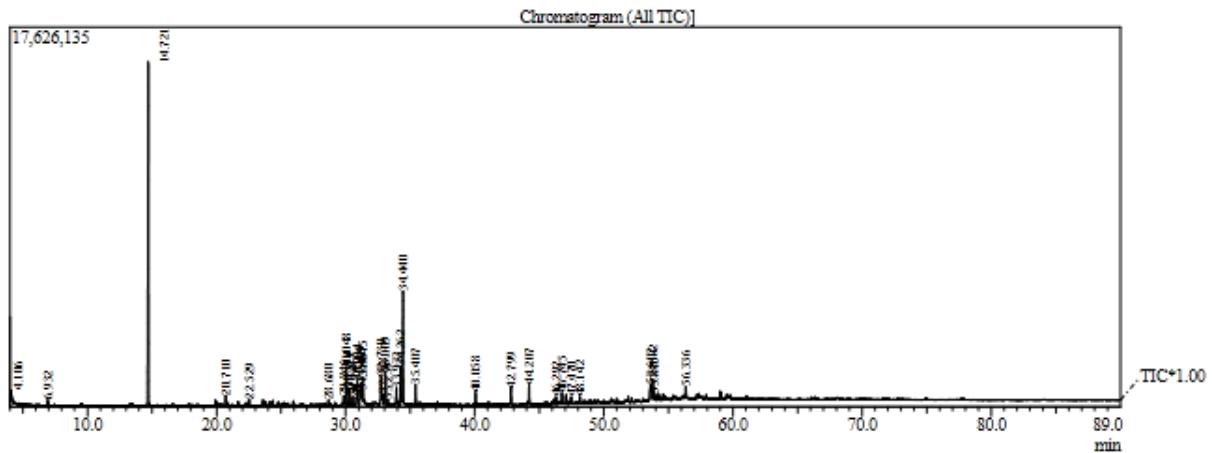


Figura 7 – Subfração D4.13

