



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

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**RAFAEL SILVA ALMEIDA**

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS  
FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E SORBIFOLINA SOBRE  
*Streptococcus mutans* ATCC 700610**

**Vitória da Conquista, BA**

**2021**

RAFAEL SILVA ALMEIDA

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS  
FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E SORBIFOLINA SOBRE  
*Streptococcus mutans* ATCC 700610**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regiane Yatsuda  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariluze Peixoto Cruz  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

**Vitória da Conquista, BA**

**2021**

Biblioteca Universitária do Campus Anísio Teixeira – UFBA

ALMEIDA, Rafael Silva

Fracionamento bioguiado do extrato etanólico das folhas de *Mimosa tenuiflora* (WILLD.) Poiret e atividade antimicrobiana das frações, subfrações e sorbifolina sobre *Streptococcus mutans* ATCC 700610 / Rafael Silva Almeida. – 2021.  
96 p.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda.

Coorientadora: Profa. Dra. Mariluze Peixoto Cruz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2021.

1. Jurema-preta. 2. Cárie. 3. Antibiofilme.

I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Almeida, Rafael Silva. III. Título.

CDU: 616.314-002

**RAFAEL SILVA ALMEIDA**

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS  
FRAÇÕES, SUBFRAÇÕES E SORBIFOLINA SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC  
700610**

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,

Aprovada em 17/02/2021

Banca Examinadora



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda (Orientadora)

Doutora em Odontologia

Universidade Federal da Bahia



---

Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos (Examinador)

Doutor em Microbiologia

Universidade Federal da Bahia



---

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira (Examinador)

Doutor em Química

Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho aos meus pais Cosme e Helena por serem minha maior referência de dedicação e amor à vida. A minha família, amigos e colegas por me incentivar e acreditarem no meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela minha vida e pela vida de todos que passaram e que estão comigo em todas jornadas, especialmente nessa. Agradeço por ter saúde, amigos, pelas bênçãos, ensinamentos, provações e conquistas.

Agradecimentos à minha orientadora Regiane Yatsuda, pela amizade e pela brilhante orientação concedida desde a graduação até o momento. Assim como, agradeço a minha coorientadora Mariluze Cruz, profissional excelente, sem a sua orientação grande parte desse trabalho não seria possível ser realizado. Mulheres, professoras e pesquisadoras admiráveis, dignas de inspirações.

À minha família, em especial aos meus pais Cosme e Helena - pela criação, pela paciência, pelo exemplo de honestidade e persistência. Obrigado pelo incentivo e confiança, por todas as broncas que certamente contribuíram para a construção desse homem que sou hoje.

Aos meus irmãos Matheus e Alana, o olhar leve e puro de vocês me dava conforto para não desistir, agradeço por todo amor e amizade. Aos meus tios, primos e primas, especialmente Tia Nice por todas as ligações e palavras de conforto; e Tia Nalva por todo incentivo.

Ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião, coordenador do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás e ao MCT/FINEP/CT-INFRA pela aquisição dos espectros de RMN.

Aos professores da UFBA pelo conhecimento compartilhado, a amizade e ajuda dos técnicos na pessoa de Janeide; e à banca por aceitar o convite e por enriquecer ainda mais esse trabalho. À minha amiga Beatriz pelos momentos compartilhados durante esses dois anos, pela paciência e pelo conforto nos laboratórios, nas aulas, corredores e demais áreas da UFBA.

A meus companheiros e amigos de laboratório e do ‘grupo mutans’ pelos dias, ensinamentos vivenciados, momentos de descontração e compromisso, sem sombra de dúvidas, eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês. A Lorena e Talita pelas conversas e trocas no laboratório de química orgânica. Thiago por sempre ter uma solução para tudo e estar sempre disponível.

Manuela, Brenda e Louise, obrigado por existirem, agradeço por tudo, por toparem enfrentar esse projeto comigo, esse trabalho não seria possível sem as suas contribuições e amizade. A Lucas, pelas conversas, amizade, e experiências compartilhadas.

Obrigado a todos os amigos que não estão dentro dos muros da universidade, mas suportaram ouvir minhas queixas, me aconselharam e possibilitaram que esses dois anos fossem anos leves, felizes e proveitosos.

A positividade, a energia contagiante e toda a confiança de vocês foram essenciais para a construção dessa dissertação. Obrigado!

**Meu amor pela ciência não exclui a minha fé. A ciência é outra linguagem que usamos para falar dos mesmos milagres dos quais a fé fala.**

**(kala Dandekar, Sanse8)**

## RESUMO

ALMEIDA, R. S. **Fracionamento bioguiado do extrato etanólico das folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret e atividade antimicrobiana das frações, subfrações e sorbifolina sobre *Streptococcus mutans* ATCC 700610.** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2021.

*Mimosa tenuiflora* é conhecida popularmente como jurema-preta, amplamente distribuída no nordeste do Brasil, e utilizada em muitas comunidades para o tratamento de diversas doenças. *Streptococcus mutans* são patógenos gram-positivos formadores de biofilmes patogênicos e o principal agente etiológico associado ao desenvolvimento da cárie dental. Neste trabalho foi realizado um estudo bioguiado de fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Mimosa tenuiflora* e análise da atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *S. mutans* ATCC 700610. Extrato etanólico (EEMT), frações de hexano (FHMT), diclorometano (FDMT) e acetato de etila (FAEMT), e subfrações de FDMT foram testados na determinação de Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida (CBM), inibição da aderência celular (CIMA) com células planctônicas de *S. mutans*. Compostos foram identificados na FDMT e nas subfrações ativas por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM), e o composto 5,6,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (sorbifolina) foi identificado por ressonância magnética nuclear (RMN – H<sup>1</sup>). A atividade antimicrobiana de FDMT foi avaliada *in vitro* quanto à inibição da formação do biofilme, inibição da via glicolítica (formação de polissacarídeos), inibição da produção de ácido (pH drop), inibição da aciduricidade (permeabilidade à prótons), inibição da produção de DNA extracelular (quantificação de eDNA). A análise fitoquímica dos extratos por cromatografia de camada delgada revelou a presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, ácidos fenólicos, polifenóis, saponinas e taninos. Compostos bioativos identificados em FDMT foram galato de etila (14,25%), sorbifolina (4,66%), ácido gálico (3,55%), ácido láctico (3,24%), ácido palmítico (1,42%), ácido salicílico (0,23%) e ácido 4-hidroxibenzoico (0,22%), e nas subfrações foram propilenoglicol, ácido láctico, ácido oxálico, R-(3)-ácido hidroxibutírico, ácido salicílico, 4-ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido protocatecólico, galato de etila, ácido gálico, ácido palmítico e sorbifolina, em diferentes concentrações e distribuição. EEMT apresentou CIM – 31,25 µg/mL, CBM – 62,5 µg/mL e CIMA – 15,75 µg/mL, e FDMT foi a fração mais bioativa CIM – 15,62 µg/mL, CBM – 31,25 µg/mL e CIMA – 7,875 µg/mL. A sorbifolina apresentou somente atividade bacteriostática (CIM 125 µg/mL) contra *S. mutans* e está presente em FDMT



e nas suas subfrações D5.8, D6.6, D6.7, D5.8.1 e D6.6.1. FDMT 6,25 mg/mL demonstrou atividade bactericida (diminuição CFU/biofilme), redução da produção de glucanos solúveis (FDMT 3,125 mg/mL) e insolúveis (FDMT 3,125 e 6,25 mg/mL), diminuindo níveis de eDNA (FDMT 3,125 e 6,25 mg/mL) em biofilmes formados maduros em relação ao grupo veículo (Etanol 10%, v/v) ( $p < 0,05$ ). FDMT (3,125 mg/mL) reduziu a produção de ácido do biofilme de *S. mutans* no período de 30 a 120 min em comparação ao veículo ( $p < 0,05$ ). O pH final em 120 min foi de 6,83 para clorexidina, 5,36 para FDMT e 4,4 para veículo. FDMT (6,25 mg/mL) reduziu a permeabilidade de prótons da membrana celular de *S. mutans* em 80, 82 e 120 min em comparação com o veículo ( $p < 0,05$ ). Desta forma, a fração de diclorometano possui vários compostos bioativos que agem de forma sinérgica na inibição da formação do biofilme cariogênico com atividade bacteriostática/ bactericida, atuando principalmente na inibição dos principais fatores de virulência de *S. mutans*, como a produção de polissacarídeos extracelulares, DNA extracelular, e diminuição da acidogenicidade e aciduricidade. Este é o primeiro relato da atividade bacteriostática de sorbifolina sobre *S. mutans*. Deste modo, *M. tenuiflora* é uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos anti-placa e/ou anti-cárie, sendo que novos estudos devem ser realizados futuramente *in vivo*.

**Palavras-chave:** Jurema preta, antibiofilme, anticariogênico, 5,6,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona, cárie.

## ABSTRACT

ALMEIDA, R.S. **Bioguided fractionation of the ethanolic extract of the leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret and antimicrobial activity of fractions, subfractions and sorbifolin on *Streptococcus mutans* ATCC 700610.** Dissertation (Master in Biosciences) - Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2021.

*Mimosa tenuiflora* is popularly known as “black jurema”, widely distributed in northeastern Brazil, and used in many communities to treat various diseases. *Streptococcus mutans* is gram-positive microorganism that form pathogenic biofilms and the main etiological agent associated with the development of dental caries. In this work, a bioguided study of fractionation of the ethanolic extract of *M. tenuiflora* leaves and analysis of antimicrobial activity *in vitro* against *S. mutans* ATCC 700610. Ethanol extract (EEMT), hexane fractions (FHMT), dichloromethane (FDMT) and ethyl acetate (FEAMT), and subfractions of FDMT were tested in the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (CBM), inhibition of cell adhesion (MIC) with planktonic cells of *S. mutans*. Compounds were identified in the FDMT and in active subfractions by gas chromatography coupled to the mass spectrum (GC-MS), and the compound 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (sorbifolin) was identified by <sup>1</sup>H-NMR. The antimicrobial activity of FDMT was evaluated *in vitro* for inhibition of biofilm formation, inhibition of the glycolytic pathway (polysaccharide formation), inhibition of acid production (pH drop), inhibition of acidity (proton permeability), inhibition of the production of extracellular DNA (quantification of eDNA). Phytochemical analysis of extracts by thin layer chromatography revealed the presence of alkaloids, steroids, flavonoids, phenolic acids, polyphenols, saponins and tannins. Bioactive compounds identified in FDMT were ethyl gallate (14.25%), sorbifolin (4.66%), gallic acid (3.55%), lactic acid (3.24%), palmitic acid (1.42%), salicylic acid (0.23%) and 4-hydroxybenzoic acid (0.22%), and in the subfractions were propylene glycol, lactic acid, oxalic acid, R-(3) hydroxybutyric acid, salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, ethyl gallate, gallic acid, palmitic acid and sorbifolin, in different concentrations and distribution. EEMT presented MIC - 31.25 µg/mL, MBC - 62.5 µg/mL and MICA - 15.75 µg/mL, and FDMT was the most bioactive fraction MIC - 15.62 µg/mL, MBC - 31.25 µg/mL and MICA - 7.875 µg/mL. Sorbifolin showed only bacteriostatic activity (MIC 125 µg/mL) against *S. mutans* and is present in FDMT and its subfractions D5.8, D6.6, D6.7, D5.8.1 and D6.6.1. FDMT 6.25 mg/mL (200 x MBC) demonstrated bactericidal activity (decreased CFU/biofilm), reduced production of soluble (FDMT 3.125 mg/mL) and insoluble (FDMT 3.125 and 6.25 mg/mL)

polysaccharides, decreasing levels of eDNA (FDMT 3.125 and 6.25 mg/mL) in mature biofilms formed in relation to the vehicle group (Ethanol 10%, v/v) ( $p < 0.05$ ). FDMT (3.125 mg/mL) reduced the acid production of the *S. mutans* biofilm in the period of 30 to 120 min compared to the vehicle ( $p < 0.05$ ). The final pH in 120 min was 6.83 for chlorhexidine, 5.36 for FDMT and 4.4 for vehicle. FDMT (6.25 mg/mL) reduced proton permeability of the *S. mutans* cell membrane in 80, 82 and 120 min compared to the vehicle ( $p < 0.05$ ). Thus, the dichloromethane fraction has several bioactive compounds that act synergistically in inhibiting the formation of cariogenic biofilm with bacteriostatic / bactericidal activity, acting mainly in inhibiting the main virulence factors of *S. mutans*, such as the production of extracellular polysaccharides, extracellular DNA, and decreased acid tolerance and acidogenic capacity. This is the first report of sorbifolin identified in leaves of *M. tenuiflora* and bacteriostatic activity on *S. mutans*. Thus, *M. tenuiflora* is a promising source for the development of new phytotherapies and phytopharmaceuticals with anti-plaque and /or anti-caries activities, and further studies *in vivo* should be carried out in the future.

**Keywords:** Black jurema, antibiofilm, anticariogenic, 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone, caries.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A	Absorbncia
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de alumnio
ANOVA	Análise de varincia
ATP	Trifosfato de adenosina
BHI	Brain Heart Infusion
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH	Hidroxiapatita
CBM	Concentrao bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CIM	Concentrao inibitória mínima
CIMA	Concentrao inibitória mínima da aderência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DCM	Diclorometano
Dex	dextranase extracelular
DNA	cido desoxirribonucleico
DO	Densidade ptica
eDNA	ácido desoxirribonucleico extracelular
EEMT	Extrato etanólico de <i>Mimosa tenuiflora</i>
EtOAC	Acetato de etila
EtOH	Etanol
FAEMT	Frao acetato de etila de <i>Mimosa tenuiflora</i>
FDMT	Frao diclorometano de <i>Mimosa tenuiflora</i>
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto de ferro III ou cloreto férrico
FFNSC1.3	Mass spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds
FHMT	Frao hexano de <i>Mimosa tenuiflora</i>
FLONA	Floresta nacional
GTFs	Glicosiltransferases
H <sub>2</sub> O	gua

HEX	Hexano
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Ferrocianeto de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MeOH	Metanol
MEP	Metileritritol fosfato
MEV	Acetato mevalonato
MT	Medicina tradicional
NaOH	Hidróxido de sódio
NIST 08	National Institute of Standards and Technology - Mass Spectral Library
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para Análise
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEC	Polissacarídeo extracelular
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
RPM	Rotações por minuto
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TE	Tampão TRIS HCl - EDTA
TMCS	Trimetilclorossilano
UESB	Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WILEY 8	Mass Spectral Library

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (A) Folhas e inflorescência de *M. tenuiflora*. (B) *M. tenuiflora* em ambiente natural, hábito arbustivo. (C) Folhas de *M. tenuiflora*. 26
- Figura 2** - À esquerda cromatografia em coluna líquida. À direita cromatografia em coluna seca finalizada pronta para secção. 31
- Figura 3** - Cromatografia de camada delgada (CCD) das subfrações D1 - D6. À esquerda visualização do CCD sob luz UV 265nm, à direita: placa revelada com vapores de iodo. 32
- Figura 4** - Cristais insolúveis observados nas subfrações D5.8 e D6.6 33
- Figura 5** - Fluxograma do fracionamento químico bioguiado de compostos com atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *M. tenuiflora*. 34
- Figura 6** - 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. 38
- Figure 1** - Total ion chromatogram (TIC) of the D6.6.1 subfraction. Evidence of the isolation of the flavonoid identified as 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (Sorbifolin). 71
- Figure 2** - Chemical structure of Sorbifolin 72
- Figure 3** - Influence of the dichloromethane fraction of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves on the decrease of glycolytic pathway in biofilms of *Streptococcus mutans* ATCC 700610. 77
- Figure 4** - Influence of the dichloromethane fraction of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves on membrane permeability to protons in biofilms of *Streptococcus mutans* ATCC 700610. 78
- Figure 1** - Results of preliminary photochemical analyzes of the crude extract. fractions and subfractions of *Mimosa tenuiflora* leaves. 91
- Figure 2.** Sorbifoline <sup>1</sup>H RMN spectral data [500 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, δ (ppm)]. 92
- Figure 3.** Sorbifoline <sup>13</sup>C NMR spectral data [125 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, δ (ppm)]. 93

## LISTA DE TABELAS

- Table 1** - Phytochemical analysis of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and subfractions of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves performed by the thin layer chromatography. 62
- Table 2** - Antibacterial activity and yield of ethanolic extract, fractions, subfractions and Sorbifolin from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves against *Streptococcus mutans* ATCC 700610. 63
- Table 3** - Relative percentage of the chemical constituents identified in the Dichloromethane fraction and its subfractions from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves obtained by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. 68
- Table 4** - Effect of treatments at different concentrations of the dichloromethane fraction (FDMT) of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret on the biofilm of *Streptococcus mutans* ATCC 700610. 75

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1. <i>Streptococcus mutans</i> E <i>BIOFILME CARIOGÊNICO</i> .....	20
2.2. CÁRIE .....	23
2.3. MEDICINA TRADICIONAL .....	24
2.4. <i>Mimosa tenuiflora</i> (WILLD.) POIRET (JUREMA PRETA).....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	30
4.2. PREPARO DOS EXTRATOS.....	30
4.3. PREPARO DAS FRAÇÕES .....	31
4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	34
4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA- ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) .....	35
4.6. ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	36
4.7. MICRORGANISMOS E CULTIVO .....	36
4.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DA ADERÊNCIA CELULAR	36
4.8.1. Concentração inibitória mínima (CIM) .....	36
4.8.2. Concentração bactericida mínima (CBM).....	37
4.8.3. Concentração inibitória mínima da aderência (CIMA) .....	37
4.9. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>S. mutans</i> .....	38
4.9.1. Confeção dos corpos de prova .....	38
4.9.2. Preparo do inóculo e incubação do <i>S. mutans</i> .....	38
4.9.3. Biomassa (peso seco) .....	39
4.9.4. Viabilidade bacteriana (contagem de UFC) .....	39
4.9.5. Quantificação de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis e solúveis em álcali) 39	
4.9.6. Queda de pH (via glicolítica).....	40
4.9.7. Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons .....	40
4.9.8. Extração e quantificação de DNA extracelular (eDNA) .....	41
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	41
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>



<b>6. CAPÍTULO I.....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>966</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática bastante antiga, muitas delas são conhecidas pelo grande potencial contra uma série de doenças e os seus sintomas, como inflamação, dor, febre entre outras (CARNEIRO et al., 2014; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica o uso de plantas medicinais como uma alternativa para o combate à doenças, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, (CARNEIRO et al., 2014). Fontes vegetais produzem uma série de metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento microbiano, essas propriedades antimicrobianas têm sido alvo de interesse de diversos pesquisadores. Gonçalves e colaboradores (2005) cita alguns grupos de compostos químicos com propriedades antimicrobianas, como os terpenoides, alcaloides, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, entre outros. Nunes e colaboradores (2008) relata a presença da maioria desses compostos em plantas do gênero *Mimosa*.

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret é popularmente conhecida como jurema-preta, é uma planta com característica arbustiva, nativa do Brasil e amplamente distribuída pelo nordeste brasileiro. Segundo Souza e colaboradores (2008), *Mimosa hostilis*, sinónimo a *M. tenuiflora*, é utilizada na medicina popular como um analgésico e anti-inflamatório, apresenta ação sedativa, e também é administrada no tratamento de úlceras, bronquite e erisipelas.

*Streptococcus mutans* é um patógeno associado à algumas doenças, sendo o principal agente etiológico para a formação da cárie dentária, uma doença bucal infecciosa que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, um grande problema de saúde pública que atinge fortemente o orçamento de governos e famílias (KASSEBAUM et al., 2017). A cárie causa grandes impactos negativos para o paciente, desde efeitos estéticos até ações na qualidade de vida, impactando nas atividades diárias (PITTS et al., 2017). É um ótimo produtor de ácido, e possui a capacidade de sobreviver em ambientes de baixo pH, além de formar biofilme (CHEN et al., 2016). *S. mutans* também é relacionado em casos de endocardite bacteriana, infecção que acomete o endocárdio e envolve as valvas cardíacas, exige intensa antibioticoterapia e pode ser fatal (NOMURA et al., 2020).

O biofilme é um microambiente protegido, formado pela agregação de microrganismos e de diversas biomoléculas, especialmente polissacarídeos, proteínas e DNA. *S. mutans* produz

moléculas aderentes pela ação das enzimas glucosiltransferases (GTFs) que fornecem um arcabouço inicial para a colonização de superfícies (LEMOS et al., 2019). A comunicação por meio de *Quorum sensing* entre os microrganismos do biofilme aumenta sua virulência e capacidade de proliferação (SAXENA et al., 2019).

Para os problemas bucais, é fortemente recomendado uma boa higienização bucal e diminuir o consumo de alimentos ricos em carboidratos, e quando realizada da forma correta, são práticas eficazes para diminuir a incidência de doenças causadas por microrganismos (PITTS et al., 2017). No geral muitos antibióticos podem ser utilizados para contenção da proliferação de *S. mutans*, mas o constante surgimento de cepas resistentes é um grande problema que parece estar longe de ser superado, o que pode ser um ponto limitante. Alguns pesquisadores sugerem intervenções que visam apenas inibir fatores de virulência sem efeito bactericida, agindo sobre componentes da matriz do biofilme, e desta forma, poderiam minimizar as causas da resistência (ANDRÉ et al., 2017). O antibiótico de referência utilizado nas condições de saúde que afetam a cavidade oral é o gluconato de clorexidina a 0,12%, que apesar de ser o padrão-ouro, este medicamento apresenta uma série de efeitos adversos aos tecidos, como o escurecimento dos dentes e língua, perda do paladar, dor, e gosto desagradável. (PEGORARO et al., 2014)

Deste modo, devido à falta de agentes antimicrobianos com menos efeitos adversos contra *S. mutans*, se faz necessário a realização de mais estudos farmacológicos para desenvolvimento de novos fármacos que inibam a formação da cárie dental. Neste contexto, a planta *M. tenuiflora* é uma fonte promissora para uso como fitoterápico ou para isolamento de compostos bioativos que possam ter atividade antimicrobiana ou modular os fatores de virulência de *S. mutans*. Assim, este trabalho teve como objetivo identificar e isolar o(s) composto(s) bioativos a partir das frações e subfrações do extrato etanólico das folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret e avaliar a ação antimicrobiana e os efeitos sobre o biofilme dental de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 .

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Streptococcus mutans* E BIOFILME CARIOGÊNICO

*Streptococcus mutans* são cocos gram-positivos, ovalados, habitualmente se agrupam em cadeias, são anaeróbicos facultativos, sobrevivendo em concentrações de oxigênio inferiores a concentrações atmosféricas normais (microaerófilos); em ambientes ácidos (acidúricos); e produtores de ácidos (acidogênicos); além de serem grandes formadores de biofilme (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). *S. mutans* é o principal microrganismo associado com a formação da cárie dentária (CHEN et al., 2016), e por ser um patógeno muito versátil, também está relacionado à endocardite infecciosa, doença que acomete o endocárdio e envolve as valvas cardíacas (VINCENT; OTTO, 2018), também está relacionado com a presença em infecções cerebrais, nefropatia por IgA e aterosclerose (LEMOS et al., 2019).

A cárie dentária ocorre quando há um desequilíbrio na relação físico-química entre o substrato dentário e o biofilme cariogênico formado sobre essa estrutura (MASKE et al., 2017). A cárie pode, portanto, ser considerada uma infecção endógena que pode ocorrer quando membros da microbiota residente obtêm uma vantagem ecológica seletiva sobre outras espécies, perturbando o equilíbrio homeostático do biofilme e, assim, iniciando o processo da doença (PITTS et al., 2017). Como principal agente etiológico da cárie dentária humana, *S. mutans* reside principalmente em biofilmes que se formam nas superfícies dos dentes, também conhecidas como placa dentária (LEMOS et al., 2019). O biofilme cariogênico possui alta atividade metabólica e é de difícil remoção completa (BOWEN; KOO, 2011), é um microambiente protegido e as células que ali residem têm menos contato com agentes externos, como os antibióticos; pois, além de ter uma penetração reduzida, sua composição química é capaz de repelir tais substâncias (DAVIES, 2003). O biofilme também aumenta a resistência das células bacterianas por ativação de mecanismos além dos já conhecidos para as células planctônicas, como mutações no sítio de ação, bombas de efluxo, enzimas modificadoras de drogas e proteínas neutralizadoras de drogas (LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014).

Os microrganismos cariogênicos associados ao biofilme metabolizam carboidratos formando ácidos que irão interferir na homeostase de regulação da desmineralização e remineralização do dente, causando uma intensa perda dos componentes essenciais para a manutenção das estruturas dentárias, quando a desmineralização é mais prevalente, ocorre a formação das cavitações, o desenvolvimento da cárie (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

Com relação à composição do biofilme cariogênico em peso seco, cerca de 10 a 20 % do biofilme é formado por glucanos, 1 a 2 % de frutanos, aproximadamente 40 % de proteínas de origem bacteriana ou mamífera, além de lipídios e minerais como cálcio, fósforo, magnésio e flúor; podendo claramente variar a sua composição de acordo com o tipo de alimentação (BOWEN; KOO, 2011).

O biofilme oral é um ecossistema microbiano dinâmico com diferentes comunidades microbianas associadas aos três estágios reversíveis do processo de cárie (estágio de estabilidade dinâmica, estágio acidogênico e estágio acidúrico), a sucessão ecológica bacteriana mutável ocorre no biofilme em cada estágio do processo de cárie, dependendo da gravidade e da frequência da acidificação do biofilme (TAKAHASHI; NYVAD, 2008). É somente quando o ambiente acidogênico é prolongado que bactérias altamente acidúricas, como *S. mutans* ou lactobacilos, começam a dominar e substituir o não-*Streptococcus* de 'baixo pH', *Actinomyces* spp. ou *Veillonella* spp., que são as principais espécies que povoam o biofilme nos estágios iniciais de lesões de cárie incipientes (não cavitadas). Mesmo no estágio altamente acidúrico, a composição microbiana e a perda mineral podem ser revertidas, desde que as propriedades acidogênicas / acidúricas do biofilme sejam modificadas pela adoção de medidas preventivas eficazes (por exemplo, restringindo as exposições a açúcar) (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018; TAKAHASHI; NYVAD, 2011). As principais espécies bacterianas cariogênicas em microbiomas associados à cárie são: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, além de não- *S. mutans*, *Bifidobacterium* e *Prevotella* spp. (TANNER; KRESSIRER; FALLER, 2016).

Para sobreviver em meio ácido *S. mutans* utiliza do mecanismo ativo dependente de ATP para realizar a extrusão de prótons através da bomba F-ATPase ( $F_1F_0$ -ATPase) que tem sua transcrição induzida em baixas condições de pH para alcalinizar o espaço citoplasmático, mantendo um pH intracelular, aproximadamente, uma unidade de pH maior que a do ambiente extracelular, evitando assim, prejuízos à atividade enzimática e danos ao genoma que podem ser fatais (BAKER; FAUSTOFERRI; QUIVEY, 2017; BENDER; SUTTON; MARQUIS, 1986). O estresse ácido causa uma série de mudanças na permeabilidade da membrana, e todas juntas são conhecidas como resposta à tolerância ácida (RTA), também ocorrendo alterações da membrana plasmática com aumento na proporção de ácidos graxos monoinsaturados sobre a quantidade de ácidos graxos saturados, e por aumentar comprimento das cadeias de carbono que compõem esses ácidos graxos da membrana (FOZO; QUIVEY, 2004).

*S. mutans* possuem outro importante fator de virulência que é a capacidade de aderir

firmemente à superfície do dente decorrente da produção de polissacarídeos extracelulares (PEC), produzidos principalmente por intermédio de três enzimas que são denominadas de glicosiltransferases (GTFs). As GTFB, GTFC e GTFD metabolizam sacarose em glucanos, um tipo de polissacarídeo formado pela união de monómeros de D-glicose por meio de ligações glicosídicas (LIU et al., 2017). Em meio a dietas ricas em sacarose (0,25% a 5%), *S. mutans* induz uma regulação positiva nos genes que codificam essas enzimas, favorecendo a sua expressão. São observados dois tipos mais comuns de glucanos extracelulares, os insolúveis em água sintetizados pelas GTFB e GTFC (genes *gtfB* e *gtfC*), que são ricos em ligações  $\alpha$ -1,3-glicosídicas e frequentemente são encontradas na superfície da célula. O outro tipo, são os glucanos solúveis em água sintetizados pela GTFD, codificada pelo gene *gtfD*, formam glucanos ricos em ligações  $\alpha$ -1,6-glicosídicas, e são encontradas de forma livre na matriz extracelular. (BOWEN; KOO, 2011)

O acúmulo destes glucanos na matriz dental contribuem para a fixação, colonização e a difusão de nutrientes e ácidos, bem como promove a ligação celular à superfície dentária e a outros microrganismos orais (BANAS et al., 2003; DIBDIN; SHELLIS, 1988; LEMOS et al., 2019; LYNCH et al., 2007; YAMASHITA et al., 1993). Os polissacarídeos extracelulares (PEC) são produzidos por enzimas que metabolizam a sacarose, eles contribuem para a organização tridimensional da matriz extracelular, essa estruturação contribui para difusão de ácido, a queda do pH e conseqüentemente a desmineralização do esmalte (CURY et al., 2000). PEC também são reconhecidos como uma reserva de energia extracelular, em situações de baixo aporte nutricional são hidrolisados e podem ser metabolizados, contribuindo ainda mais com a produção ácidos (LEMOS et al., 2019). A matriz extracelular é formada por exopolissacarídeos, ácidos nucleicos (eDNA, eRNA), proteínas e lipídeos (FLEMMING et al., 2016).

O DNA extracelular (eDNA) são partículas de material genético produzido e expelido pelos microrganismos pela via de vesículas de membrana independentes da lise, e também eDNAs provenientes da lise celular (IBÁÑEZ DE ALDECOA; ZAFRA; GONZÁLEZ-PASTOR, 2017). A liberação de DNA é coordenada principalmente pela densidade celular e também em resposta ao acúmulo de sinais de detecção de quórum; ficam em suspensão servindo como suporte para ancoragem entre as células elevando a montagem da matriz, carregando genes de resistência, possibilitando a troca de informações genéticas e pode estar envolvido no reparo de danos ao DNA, influenciam as propriedades mecânicas da matriz e a virulência de biofilmes, o caráter negativo pode contribuir com a resistência do biofilme, uma vez que muda

as propriedades de difusão de moléculas como para os antimicrobianos catiônicos (LIAO et al., 2014). A utilização de estratégias que diminuam a quantidade de PEC e de eDNA é visto como um tratamento promissor para diminuir a formação dos biofilmes, sem criar resistência bacteriana, visto que esses dois componentes são encontrados em grande quantidade e interagem entre si para formar um biofilme consistente (CASTILLO PEDRAZA et al., 2017; KLEIN et al., 2015)

## 2.2. CÁRIE

A cárie é um problema de saúde bucal que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, um estudo global envolvendo pesquisas epidemiológicas de 195 países, publicados entre 1990 e 2015, revelou um aumento de 2,5 para 3,5 bilhões de pessoas com doenças bucais não tratadas como a cárie, que continuam sendo grandes desafios de saúde pública (KASSEBAUM et al., 2017). Muitos fatores estão associados ao processo de formação da cárie, inerentes a cada hospedeiro, como a susceptibilidade do sistema imune, os fatores genéticos, a produção salivar, o pH oral, o hábito e o modo correto de higienização, o estilo de vida alimentar, principalmente no que se refere ao consumo de alimentos ricos em carboidratos fermentáveis. Sem tratamento o paciente pode perder o dente e a infecção pode se espalhar por toda a boca, promover dor intensa e desconforto e acaba afetando a função mastigatória, a fala, o sorriso, o ambiente psicossocial e a qualidade de vida (MATHUR; DHILLON, 2018; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007)., além de poder atingir a corrente sanguínea e provocar endocardite bacteriana (NOMURA et al., 2020).

Os carboidratos são um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da cárie, pois contribuem para a sobrevivência e o desenvolvimento de bactérias cariogênicas, como por exemplo, *Streptococcus mutans* (BARBIERI et al., 2007; MATSUMOTO-NAKANO, 2018). O metabolismo de carboidratos pelas bactérias produz ácidos e provoca a desmineralização dos dentes e causa a cavitação das estruturas dentárias, gerando uma seleção e agregação de bactérias patogênicas acidúricas que contribuem com a progressão da doença (FIORETTI; HAÏKEL, 2010; LIMA, 2007; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). O ácido láctico é o principal ácido produzido por *S. mutans*, conteúdo importante para provocar a desmineralização (LOESCHE, 1986). Esmalte, como é chamada a camada mais superficial dos dentes, são constituídas de aproximadamente 95% de hidroxiapatita, formado por fosfato de cálcio cristalino ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), um mineral pouco solúvel em água, porém que se dissolve em

ácidos. Fisiologicamente, componentes da saliva como íons cálcio, fosfato e proteínas compõem o sistema tamponante que impede grandes flutuações no pH, sendo que estes precipitam e remineralizam os dentes (SIMMER et al., 2020).

O controle da formação da cárie é feito com o uso de agentes químicos e mecânicos. A prática mais disseminada é a de escovação aliada ao uso de fio dental, e antissépticos bucais podem auxiliar na eliminação de restos alimentares e microrganismos cariogênicos, com o objetivo de diminuir a formação de biofilmes (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). O gluconato de clorexidina é um agente antimicrobiano e anti-placa eficaz; é considerado o padrão ouro para odontologistas e pesquisadores devido ao largo espectro de ação, agindo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O uso prolongado de clorexidina provoca efeitos colaterais como perda do paladar, sensações comparáveis às queimaduras na mucosa e mudança da coloração dos dentes e língua (HORTENSE et al., 2017).

O flúor também é um composto químico muito utilizado no controle da cárie, não agindo sobre os microrganismos, mas tendo ação remineralizante, ou seja, possui capacidade de se incorporar à hidroxiapatita, formando a fluorapatita, sendo mais resistente aos ácidos bacterianos (SIMMER et al., 2020). O flúor é o constituinte básico de muitos produtos utilizados para higiene oral como os dentifrícios, água, enxaguatórios e géis. A fluoretação da água potável é uma medida de saúde pública na prevenção da formação da cárie, e é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde. O efeito colateral quando usado o flúor em excesso é a fluorose dentária, caracterizada pelo aparecimento de manchas esbranquiçadas nos dentes (RAMIRES; BUZALAF, 2007; SIMMER et al., 2020).

### 2.3. MEDICINA TRADICIONAL

Plantas com propriedades medicinais são utilizadas pelo o homem desde os tempos remotos (FIRMO et al., 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS) indica o uso de plantas medicinais como uma alternativa para o combate de doenças, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, indicando a fitoterapia como uma alternativa segura e eficiente à população carente que se depara com medicamentos de preço elevado (CARNEIRO et al., 2014). A OMS define medicina tradicional (MT) como uma junção de conhecimentos, habilidades e práticas providas de povos antigos utilizados na manutenção da saúde e do bem-estar; e que, medicamentos à base de plantas fazem parte desse conhecimento, podendo incluir



ervas, preparações ou produtos acabados com ativos vegetais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

O Brasil é considerado o país que possui a maior biodiversidade genética do mundo, uma riqueza estimada em 45 mil espécies vegetais, porém, existem poucas informações sobre o efeito terapêutico dessas plantas e novos dados são obtidos em uma velocidade muito lenta, o que afeta a possibilidade do uso e reconhecimento científico (CARNEIRO et al., 2014; DUTRA et al., 2016). A população que utiliza plantas medicinais com fins terapêuticos muitas vezes desconhece a possível existência de efeitos tóxicos, além de não ter entendimento quanto à sua ação terapêutica; qual forma mais correta de cultivo; preparo; quando cada planta pode ser indicada e em quais casos são contraindicadas (SCHENKEL, 1995). Reiterando, frequentemente os medicamentos à base de plantas são considerados para uso por conta da baixa incidência de efeitos colaterais, entretanto o uso não deve ser negligenciado, a farmacovigilância deve ser considerada para identificar os efeitos indesejáveis desconhecidos e garantir um uso eficaz (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

As plantas medicinais também são fontes de muitas moléculas importantes que agem protegendo as plantas contra agressores externos como a poluição ou ataque de bactérias e insetos (WINK, 2010). Essas substâncias ajudam na manutenção e sobrevivência em épocas de seca, frio ou chuvas intensas, também funcionam como sinalizadores para atrair polinizadores ou animais dispersores de sementes, são conhecidas como metabólitos secundários, pois são produzidos frente a alguma adversidade e não tem papel constitutivo, ou seja, não são produzidas o tempo todo (WINK, 2010). Essas moléculas são encontradas em todas as variedades do reino vegetal, muito visadas e estudadas em plantas comestíveis e medicinais (WINK, 2010). Os efeitos terapêuticos vão desde antibacteriano, anticâncer, antidepressivo, antienvhecimento, antifúngico, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antiofídico, antioxidante, antitumoral, antiviral, citoprotetor, diurético, neuro estimulante e tratamento da dor (CRUZ, 2013).

A utilização de plantas medicinais e/ou fitoterápicos é bastante usada na prática médica, no entanto sua aplicabilidade na odontologia clínica ainda é considerada discreta (SOYAMA, 2007). O uso de fitoterápicos na Odontologia pode apresentar como vantagens o custo acessível, fácil manuseio, grande quantidade de matéria prima se comparados a medicamentos não fitoterápicos (BÁRBARA et al., 2018). Sabe-se que a população frequentemente utiliza espécies vegetais, sob a forma de enxaguante bucal ou pomadas, para o tratamento de doenças bucais (MONTEIRO; FRAGA, 2015), por possuírem atividades anti-inflamatória,

antimicrobiana, ansiolítica e cicatrizante (BÁRBARA et al., 2018). Oliveira e colaboradores (2007), ao pesquisarem os principais estudos relacionados às plantas medicinais utilizadas em patologias da cavidade oral, encontraram relato do uso de 132 espécies de plantas, sendo a romã (*Punica granatum* L.) a mais citada para o uso odontológico. O cravo-da-índia, a camomila, a malva, a romã, a unha-de-gato e o própolis possuem ação consubstanciada por testes clínicos e laboratoriais e estão entre os fitoterápicos mais utilizados em Odontologia (BÁRBARA et al., 2018).

#### 2.4. *Mimosa tenuiflora* (WILLD.) POIRET (JUREMA PRETA)

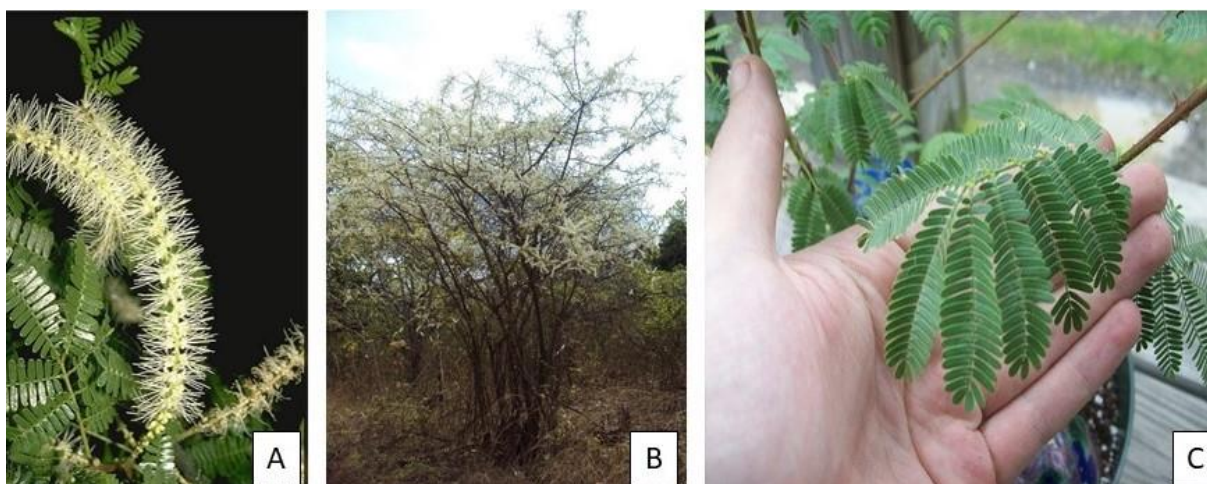
Neste contexto, o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas que possam enfraquecer as propriedades de virulência do biofilme cariogênico, sem eliminar a microbiota oral associada à saúde é de grande importância na odontologia (PHILIP; SUNEJA; WALSH, 2018). Assim, as plantas também podem contribuir na descoberta de novos antibióticos, pois é possível que produtos naturais antimicrobianos possam ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de micro-organismos patogênicos às plantas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Desta forma, podemos destacar o gênero *Mimosa* Linnaeus, pertence à família Fabaceae e subfamília Mimosoideae, caracterizada pela presença de plantas com hábitos arbustivos ou herbáceos, com folhas bipinadas e sensíveis à motilidade presente em algumas espécies (WORLD FLORA ONLINE, 2020). Segundo Monção e colaboradores (2019) mais de 199 compostos químicos já foram identificados e isolados deste gênero, sendo que os metabólitos essenciais mais representativos são os flavonoides, alcaloides, esteroides, compostos fenólicos, carotenoides, terpenoides e saponinas.

Neste gênero, destaca-se a espécie da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, popularmente conhecida como jurema-preta no Brasil, amplamente distribuída pelo nordeste brasileiro e é considerada uma espécie resistente e tolerante à diversos ecossistemas (GRÜNEWALD, 2008). *M. tenuiflora* é uma árvore de aproximadamente 6 metros de altura, leguminosa, de característica arbustiva, caule ereto e de casca rugosa, sendo que as flores são de coloração clara e dispostas em espigas complexas (figura 1), com fruto do tipo craspédio, segmentado e seco (CAMARGO-RICALDE, 2000; HSAKI et al., 2006; MAIA et al., 2010; SOUZA et al., 2008). Oliveira e colaboradores (2006) apresentaram uma atualização do nome científico da jurema-

preta com o nome *Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poiret., colocando como sinonímia a antiga nomenclatura *Mimosa hostilis*.

Historicamente, suas raízes e cascas são utilizadas em muitas comunidades indígenas no preparo de porções utilizadas em rituais religiosos e no tratamento de doenças. É utilizada por índios em toda a América do Sul por ser uma planta alucinógena, causando alterações nos estados mentais devido a presença do alcaloide triptamina (N,N-dimetiltriptamina - DMT) (SOUZA et al., 2008; CALLAWAY et al., 1999). DMT é o princípio ativo da ayahuasca, uma bebida enteógena utilizada nos rituais do Santo Daime, uma manifestação religiosa de povos da região amazônica e também do vinho de Jurema. É encontrado em diversos gêneros de plantas e também produzidos endogenamente por alguns mamíferos. (COZZI et al., 2009; DEAN et al., 2019; FONTANILLA et al., 2009; GAUJAC, 2013; LIMA, 1946).



**Figura 1** - (A) Folhas e inflorescência de *M. tenuiflora*. Autor: G.P. Lewis, RBG Kew. Disponível em: [https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Leguminosae\\_\(Mimosoideae\).htm](https://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Leguminosae_(Mimosoideae).htm) . (B) *M. tenuiflora* em ambiente natural, hábito arbustivo. Autor: Desconhecido. Disponível em: <http://chaves.rcpol.org.br/profile/species/eco/eco:pt-BR:Mimosa%20tenuiflora>. (C) Folhas de *M. tenuiflora*. Autor: Drewpiter. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mimosa-tenuiflora-Jurema-2.jpg>.

Souza e colaboradores (2008) apontam que *M. hostilis* é utilizada na medicina popular como um analgésico e anti-inflamatório, apresenta ação sedativa, e também é administrada no tratamento de úlceras, bronquite e erisipelas (infecção causada por microrganismos). No estudo de MACEDO e colaboradores (2018) feito com espécies medicinais utilizadas em comunidades

do nordeste do Brasil, a *M. tenuiflora* foi relatada como uma das plantas mais versáteis em relação ao seu uso terapêutico para enfermidades em diferentes sistemas corporais.

*M. tenuiflora* foi o material de estudo de alguns trabalhos de bioprospecção e algumas moléculas já foram isoladas e testadas em relação às suas atividades biológicas. Meckes-Lozoya e colaboradores (1990) sugerem que a atividade antimicrobiana da casca de *M. tenuiflora* seja devido a presença de taninos. Atividade antimicrobiana foi observada contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* quando foi utilizado um extrato etanólico de *M. tenuiflora* (HEINRICH et al., 1992). Zippel e colaboradores (2009) identificaram e relacionaram a ação cicatrizante com a presença de taninos, saponinas, uma fração alcaloide, lipídios, fitoesteróis, carboidratos, lupeol nas cascas da planta, e que saponinas, taninos eram os responsáveis pela atividade citotóxica e antimicrobiana. O efeito antibacteriano e antifúngico também foi observado no estudo de Araújo e colaboradores (2018) onde utilizaram o ácido pirolímico obtidos da pirólise lenta da madeira contra estirpes resistentes a antibióticos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e dentre os compostos identificados, furfural e fenóis correspondiam a 17,43 % e 56,36 %, respectivamente. O efeito anti-inflamatório já foi comprovado em uma preparação farmacêutica com extrato de *M. tenuiflora* para tratamento em lesões na pele em humano (TELLEZ; DUPOY DE GUITARD, 1990). Cruz e colaboradores (2016) demonstraram em modelo *in vivo* que a utilização de extrato etanólico e de um composto isolado (sacuranetina) de *M. tenuiflora* reduz a percepção de dor em camundongos e também apresentou bons resultados para o efeito anti-inflamatório. Flavonoides, taninos, xantonas, triterpenos, esteroides e fenóis foram os compostos fitoquímicos identificados por Marcel e colaboradores (2016) e podem estar relacionados à ação antioxidante e anti-inflamatório do extrato hidroetanólico das cascas. Os flavonoides 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (sakuranetina), 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavona (genkwanina), 5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxiflavona (sorbifolina), 5,4'-di-hidroxi-7,8-dimetoxiflavona, e 5,7,4'-tri-hidroxi-3-metoxiflavona, 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavonol, 5,6-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol e 5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavonol foram identificados nas folhas de *M. tenuiflora* (CRUZ et al., 2016).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar o(s) composto (s) bioativos em estudo biomonitorado a partir das frações e subfrações do extrato etanólico das folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret e avaliar a atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises fitoquímicas para identificação de grupos de metabólitos secundários no extrato bruto, fração diclorometano e subfrações;
- Isolar e Identificar substâncias bioativas por fracionamento bioguiado do extrato etanólico das folhas de *Mimosa tenuiflora*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderência *in vitro* do extrato etanólico, frações e subfrações das folhas de *Mimosa tenuiflora* sobre células planctônicas de *Streptococcus mutans* ATCC 700610;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antiaderência *in vitro* da sorbifolina sobre células planctônicas de *Streptococcus mutans* ATCC 700610;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da fração de maior bioatividade nos testes com células planctônicas sobre a inibição de formação de biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC 700610;
- Avaliar a influência da fração de maior bioatividade nos testes com células planctônicas sobre os fatores de virulência (produção de polissacarídeos e DNA extracelular, aciduricidade e acidogenicidade) de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 em modelo de biofilme.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret foi realizada na FLONA – Floresta Nacional Contendas do Sincorá, uma área de cobertura florestal de espécies predominantemente nativas que tem por objetivos básicos o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica. A FLONA situa-se nos limites dos municípios de Contendas do Sincorá, Tanhaçu e Ituaçu, região de caatinga do Sudoeste Baiano. A planta coletada foi fotografada e localizada com o uso de um aparelho de GPS (S13°55'23.2" e W041°07'05.0", à 374 m de altitude). A coleta foi realizada sob consentimento do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) que concedeu o registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (Nº 12292-1) e a autorização para atividade com finalidade científica (Nº 13258-1). A atividade foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (Nº A7125E9).

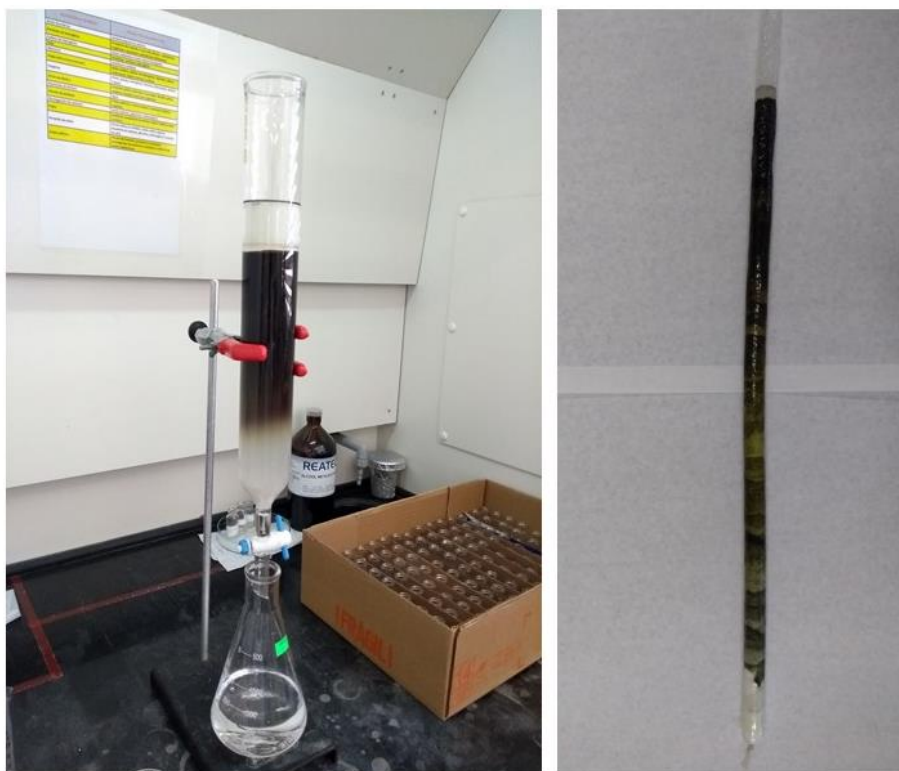
As exsicatas foram preparadas seguindo as orientações de MORI et al., (1988), *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret foi identificado pelo Prof. Dr. Avaldo de Oliveira S. Filho, por comparação no herbário e através da literatura e as exsicatas foram depositados no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) (nº HUESBVC 4907, 4980 e 4993) em Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

### 4.2. PREPARO DOS EXTRATOS

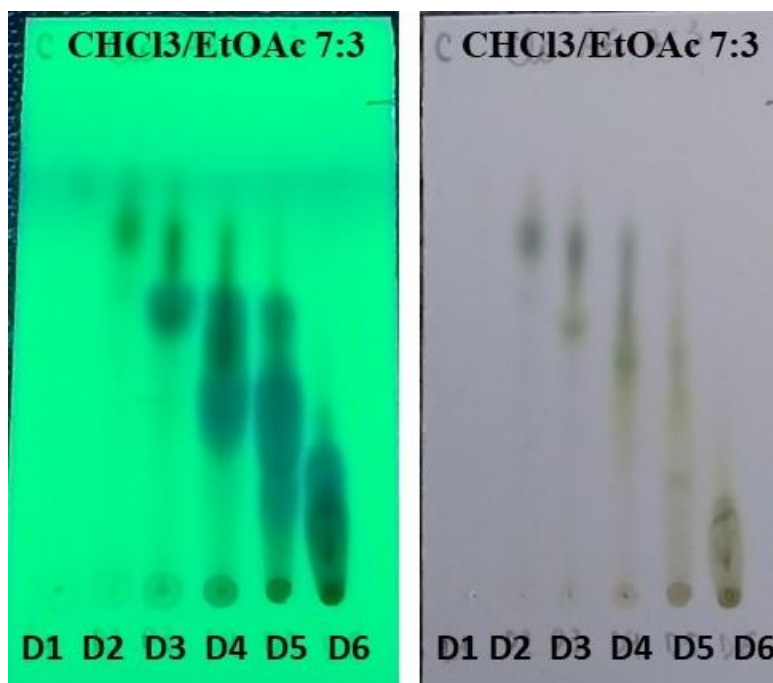
A metodologia de preparo dos extratos foi descrita por Cruz e colaboradores (2016). O extrato etanólico foi preparado a partir das folhas secas moídas (780 g) na temperatura ambiente. A maceração exaustiva foi realizada com etanol (EtOH) 99° GL, sob agitação esporádica por 72 horas. Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a 45 °C até a eliminação do EtOH, e secos em estufa de secagem a 45 °C, obtendo assim, o extrato etanólico de *M. tenuiflora* (EEMT).

### 4.3. PREPARO DAS FRAÇÕES

A obtenção das frações foi realizada a partir de 81 g do EEMT, solubilizado em uma mistura de etanol/H<sub>2</sub>O (1:1), adicionado em um funil de separação e particionado sequencialmente (extração líquido-líquido), com solventes em ordem crescente de polaridade, hexano - HEX (3 x 300 mL), diclorometano - DCM (3 x 300 mL) e acetato de etila - EtOAc (3 x 300 mL). A evaporação dos solventes foi realizada no evaporador rotativo à 40 °C, 50 °C e 55 °C, respectivamente, e secos em estufa de secagem a 45 °C, fornecendo as frações de hexano (FHMT), diclorometano (FDMT) e acetato de etila (FAEMT). As frações foram submetidas aos ensaios antimicrobianos. Após os testes microbiológicos, a fração FDMT que apresentou melhores resultados, foi fracionada por cromatografia em coluna seca (figura 2). Foram montadas 6 colunas distintas utilizando membrana de celulose (55 cm) preenchida com sílica gel 60 com diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm (70-230 mesh, Merck) como fase estacionária. A fase móvel foi constituída de uma mistura de clorofórmio(CHCl<sub>3</sub>)/EtOAc 7:3, e em cada coluna foi utilizado cerca de 4,5 g da FDMT solubilizada na fase móvel e incorporada em sílica. Após a completa eluição do extrato, a coluna foi seccionada com uma lâmina bisturi em 9 partes de acordo com o perfil cromatográfico, as substâncias foram removidas da sílica utilizando-se CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/Metanol (MeOH) como solventes em uma filtração a vácuo. As subfrações formadas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa utilizando placas pré-preparadas de sílica gel 60, 20 cm x 20 cm F254 da Merck (sílica gel de 0,25 mm com indicador de fluorescência UV254), sendo CHCl<sub>3</sub>/EtOAc 7:3 a fase móvel utilizada. As placas foram reveladas com luz UV  $\lambda$  254 e 365 nm no gabinete de análises de fluorescência (Spectroline - Modelo CM-10), e posteriormente revelada com vapores de iodo. As frações obtidas que apresentaram perfil cromatográfico similar foram agrupadas e a mistura de solvente foi eliminada por evaporador rotativo à 40 °C e secos em estufa de secagem a 45 °C. As subfrações foram denominadas D1, D2, D3, D4, D5, D6 (figura 3) e avaliadas nos ensaios antimicrobianos.



**Figura 2** - À esquerda cromatografia em coluna líquida. À direita cromatografia em coluna seca finalizada pronta para secção.



**Figura 3** - Cromatografia de camada delgada (CCD) das subfrações D1 - D6. À esquerda visualização do CCD sob luz UV 265nm, à direita: placa revelada com vapores de iodo.



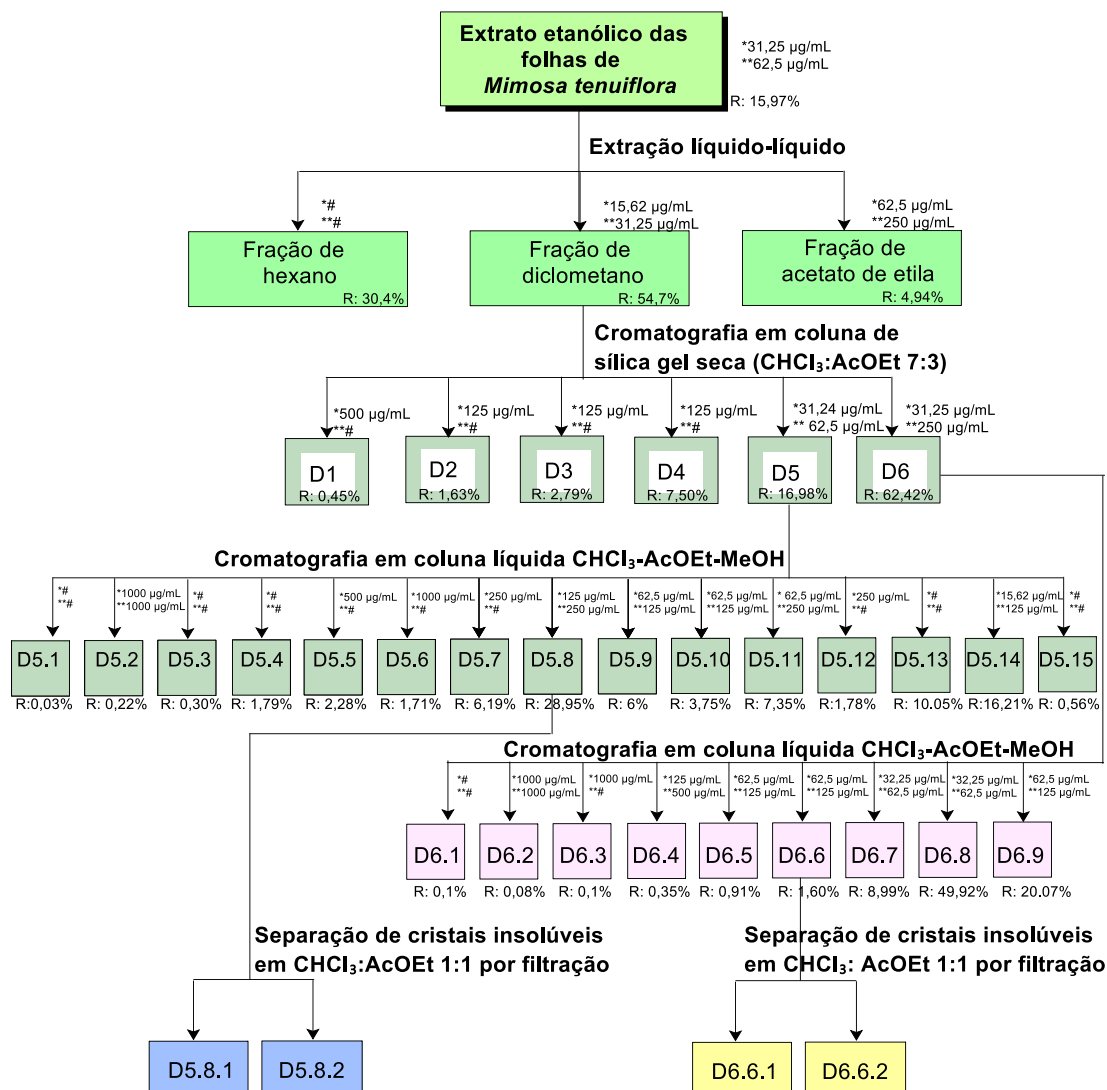
Após as análises, as subfrações D5 e D6 foram escolhidas para serem fracionadas por cromatografia líquida (figura 3) por terem apresentado bons resultados antimicrobianos e bom rendimento. Assim, 4,5 g de D5 foi solubilizado em mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  7:3, a coluna de vidro de 5,5cm de diâmetro foi preenchida até a altura de 24 cm com sílica gel 60, a amostra foi aplicada e eluída com as seguintes misturas de solvente, nessa ordem:  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  7:3 (500 mL);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  6:4 (300 mL);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  1:1 (200 mL);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  4:6 (100 mL);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  3:7 (100 mL); EtOAc. (100 mL); MeOH (200 mL). Foram coletadas 151 frações de 10 mL que foram analisadas através de CCD comparativo. Como descrito anteriormente, as frações similares foram agrupadas e o solvente foi evaporado a temperatura ambiente e secos em estufa de secagem a 45 °C. Foram obtidas 15 subfrações que receberam a seguinte denominação: D5.1, D5.2, D5.3, D5.4, D5.5, D5.6, D5.7, D5.8 D5.9, D5.10, D5.11, D5.12, D5.13, D5.15, D5.15.

A subfração D6 também foi fracionada, sendo utilizado 14,1 g dessa fração, a cromatografia e as análises foram realizadas de maneira similar à descrita anteriormente (D-5), sendo que a mistura de solvente foi diferente, sendo a seguinte:  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  6:4 (400 mL);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  1:1 (300 mL);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  4:6 (100 mL); EtOAc. (100 mL); MeOH (400 mL). Foram coletadas 130 frações agrupadas por similaridade química, resultando em 9 subfrações, denominadas: D6.1, D6.2, D6.3, D6.4, D6.5, D6.6, D6.7, D6.8, D6.9.

As subfrações D5.8 e D6.6 apresentavam cristais amarelados insolúveis na mistura 1:1 de  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  (figura 4), os quais foram separados por filtração. A substância retida no papel foi lavada com 1 mL da mistura de solvente, e foram denominadas de D5.8.1 e D6.6.1. Os filtrados foram codificados como D5.8.2 e D6.6.2. Todas as subfrações tiveram as suas atividades antimicrobianas avaliadas.



**Figura 4** - Cristais insolúveis observados nas subfrações D5.8 e D6.6



**Figura 5** - Fluxograma do fracionamento químico bioguiado de compostos com atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *M. tenuiflora*. Notas: (\*)CIM. (\*\*)CBM. R: rendimento.(#) não foi observado atividade antimicrobiana nas contrações testadas. CHCl<sub>3</sub>: clorofórmio. AcOEt: acetato de etila. MeOH: metanol.

#### 4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Análise fitoquímica do EEMT, FDMT, D1, D2, D3, D4, D5, D6 foi realizada utilizando método de CCD com reveladores específicos para identificar qualitativamente metabólitos secundários. Para cada CCD, 10 mg dos extratos foram diluídos em 1 mL de EtOH e aplicados nas placas de CDD. As placas foram eluídas utilizando uma mistura de CHCl<sub>3</sub>/EtOAc 7:3. Seis placas cromatográficas foram utilizadas para cada amostra, cada uma foi borrifada com um dos reveladores específicos para identificação de alcaloides, esteroides, flavonoides, polifenóis, saponinas e taninos (SIMÕES et al., 2007).

Para a detecção de alcaloides utilizou-se o reagente de Wagner, o aparecimento de manchas castanho-avermelhadas, no visível, indicou a presença de alcaloides. Para a análise de esteroides utilizou-se o reagente de Liebermann-Burchard, após borrifado, a placa foi levada a chapa aquecedora à 110 °C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas roxas, no visível, indicou a presença de esteroides. Para a análise de flavonoides utilizou-se o reagente  $\text{AlCl}_3$  a 1% em EtOH (m/v). A visualização das manchas efetuou-se à luz ultravioleta a 365 nm. Os flavonoides apareciam como manchas verdes fluorescentes enquanto que os ácidos fenólicos surgiam como manchas azuis fluorescentes. Para a detecção de polifenóis a placa cromatográfica foi revelada com uma mistura de 1:1 das soluções aquosas de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  1% (m/v) e  $\text{FeCl}_3$  2% (m/v). O aparecimento de manchas azuladas, no visível, indicou a presença de polifenóis. Para a detecção de saponinas utilizou-se solução etanólica de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5%, após borrifado, a placa foi levada a chapa aquecedora à 110 °C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas de coloração roxo berinjela, no visível, indicou a presença de saponinas. Para a detecção de taninos o revelador utilizado foi solução metanólica de  $\text{FeCl}_3$  a 2%. O aparecimento de manchas de coloração azul, no visível, indicou a presença de taninos. O procedimento para preparação dos reveladores está descrito no Anexo 1.

#### 4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A FDMT e as subfrações que apresentaram CIM igual ou superior a 125 µg/mL e CBM foram selecionadas para esta análise, bem como as subfrações D5.8.1, D5.8.2, D6.6.1 e D6.6.2. Antes de serem analisadas por cromatografia gasosa, as amostras foram submetidas a derivatização por sililação. Para esta reação, 3 mg da amostra foram pesados em um vial e diluídos em 60 µL de piridina. Foram adicionados 100 µL da mistura de reação de N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorossilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®) a esta solução. Esta mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1 µL da mistura foi injetado no GC-EM. O Shimadzu® GC-MS (QP2010SE-GC2010 Plus) foi usado com uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m, diâmetro interno de 0,25 µm, filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura usada no injetor, detector e interface do sistema GC-EM foi de 290 °C. A temperatura inicial da análise foi de 80 °C por 5 min, aumentando até 285 °C em 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos. O detector de massa operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e

programado para varredura de massa na faixa de 30 a 600 Da. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas dos picos separados, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8) (CRUZ et al., 2016).

#### 4.6. ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A substância isolada foi submetida análise de RMN para correta identificação. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em Espectrômetro Bruker Avance III operando a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), utilizando  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  como solvente com grau de pureza superior a 99,8%, da marca Aldrich®. Os sinais dos espectros foram registrados com base nos sinais do solvente empregado em relação ao TMS. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás sob responsabilidade do Prof. Prof. Dr. Luciano Morais Lião.

#### 4.7. MICRORGANISMOS E CULTIVO

*Streptococcus mutans* ATCC 700610 foi cultivado em meio BHI (Brain Heart Infusion - KASVI) a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ , por 24 horas e armazenado a - 80°C.

#### 4.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DA ADERÊNCIA CELULAR

##### 4.8.1. Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi obtida de acordo com o método de diluição em caldo (RODRIGUES et al., 2020) e conduzido de acordo com as diretrizes de microdiluição do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A diluição serial foi realizada com os extratos para obter concentrações variando de 31,25 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Quando necessário, foi avaliada concentrações abaixo de 31,25  $\mu\text{g/mL}$ . O inóculo de *S. mutans* ATCC 700610 foi padronizado para o valor de 0,135 absorbância em um comprimento de onda de 660 nm com uso de espectrofotômetro UV/VIS, correspondendo à escala de 0,5 Mc Farland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL). Este teste foi realizado em microplacas de 96 poços, nos quais, cada poço foi preenchido com 190  $\mu\text{L}$  de BHI

com inóculo (1:1000) e em seguida adicionados 10 µL dos diferentes extratos, exceto nos poços de controle de qualidade de esterilidade do meio onde eram adicionados apenas o BHI (190 µL). E controle de crescimento (BHI + inóculo). As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação foram adicionados 30 µL do corante resazurina (Sigma ©) nos poços onde não houve crescimento visual. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) a 0,01% é um indicador de óxido-redução, que apresenta a cor azul, sendo oxidada na presença de células viáveis a resofurina, substância de coloração róseo-avermelhada. A CIM foi determinada na menor concentração de extratos que não havia crescimento bacteriano visível e confirmada com resazurina.

#### 4.8.2. Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação do CBM, foram selecionados os poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível no ensaio de CIM, uma alíquota (8 µL) de suspensões dos poços foram adicionadas em placas contendo BHI Ágar (Rodrigues et al., 2020). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato que causou 99,9% de morte celular, ou seja, ausência de crescimento bacteriano visível na superfície do ágar.

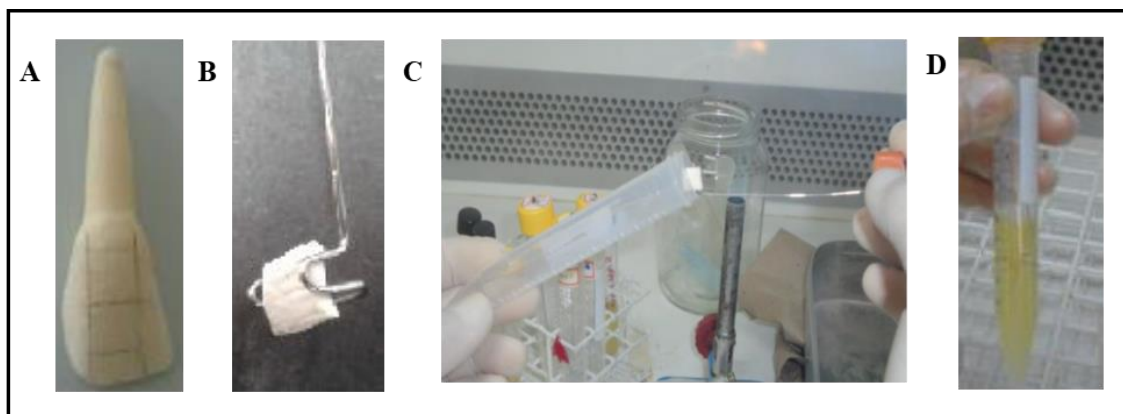
#### 4.8.3. Concentração inibitória mínima da aderência (CIMA)

Para o ensaio de aderência celular, as suspensões bacterianas da cepa de *S. mutans* ATCC 700610 foram preparadas como descrita para o CIM, entretanto, o meio BHI foi suplementado com 1% de sacarose e o teste foi conduzido em concentrações sub-CIM (RODRIGUES et al., 2020). Controle de esterilidade (BHI), controle de crescimento (BHI + inóculo), controle positivo (BHI + inóculo + clorexidina 0,12%). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi descartado e a placa lavada uma vez com água destilada, os poços foram corados com 200 µL de cristal violeta 1% por 30 minutos a temperatura ambiente, seguidas de outras três lavagens com água destilada para remover o excesso de corante. Após secagem, os resultados foram analisados de forma visual por comparação com os controles. A concentração inibitória da aderência celular foi considerada a menor concentração em que não houver aderência visível na superfície.

#### 4.9. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *S. mutans*

##### 4.9.1. Confeção dos corpos de prova

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 odontológica, sendo os blocos de esmalte 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 em autoclave.



**Figura 6** - Sequência da confecção dos corpos de prova: A- incisivo inferior permanente bovino hígido com a demarcação do tamanho dos blocos de esmalte; B- fragmento dentário no aparato confeccionado com fio ortodôntico; C- superfície sólida para formação do biofilme no tubo Falcon; D - tubo com bloco de dente inserido no caldo BHI com sacarose a 1% e inóculo bacteriano. Fonte: Grupo de pesquisa

##### 4.9.2. Preparo do inóculo e incubação do *S. mutans*

*S. mutans* ATCC 700610 foram reativados em caldo BHI suplementado com glicose a 1%, incubados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub> como descrito por Koo e colaboradores (2003) e Duarte e colaboradores (2003). O biofilme foi cultivado durante 24 horas sem perturbações para permitir a adesão inicial. No segundo dia foi realizado apenas a troca de meio. Do terceiro ao quinto dia, os biofilmes foram tratados duas vezes, 10:00 e 16:00

horas. O biofilme foi exposto aos tratamentos durante 1 minuto, enxaguados em solução salina estéril e transferidos para novo meio de cultura fresco. O biofilme foi exposto aos respectivos tratamentos: FDMT nas concentrações de 3,125 mg/mL (100 x CBM) e 6,250 mg/mL (200 x CBM), clorexidina (controle positivo) e veículo (controle negativo, etanol 10 %) num total de seis vezes e os testes foram realizados em triplicata no número total de três experimentos (n = 9).

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) e DNA extracelular.

#### 4.9.3. Biomassa (peso seco)

Após o biofilme formado, os aparatos 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 0,9% estéril. Levados ao sonicador para a dissolução do biofilme e então centrifugado a 14000 RPM por 10 min. O sobrenadante foi removido e os tubos levados ao dessecador para a secagem por completa do biofilme e determinação do peso seco.

#### 4.9.4. Viabilidade bacteriana (contagem de UFC)

Após a raspagem e dissolução em sonicador, os biofilmes formados foram diluídos seriadamente em salina estéril de até  $10^{-7}$  e posteriormente plaqueados (20  $\mu$ L) em BHI ágar. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi realizada a observação visual para avaliação do crescimento e contagem das colônias.

#### 4.9.5. Quantificação de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis e solúveis em álcali)

Os fragmentos dentários foram raspados em tubo de vidro contendo 2 mL de solução salina 0,9% estéril e sonicados, transferidos para tubo falcon de 15mL, e os tubos de vidro lavados com 3 mL de salina e unidos ao primeiro volume. 800  $\mu$ L foi retirado para microtubo de 2 mL de peso conhecido, completou-se o volume com EtOH, centrifugados a 14000 RPM por 10 min a 4° C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado novamente com 2

mL de EtOH P.A, e seco em dessecador e o peso seco determinado. Do volume que restou, foi realizado a separação dos polissacarídeos solúveis, insolúveis em água e solúveis em álcali. Para separação dos solúveis e insolúveis em água foi realizada centrifugação a 3800 RPM por 10 min 4°C. O sobrenadante (solúvel) foi transferido para tubo falcon de 50 mL e o precipitado formado (insolúvel) foi lavado 2 vezes com 4 mL de água destilada, sempre transferindo o sobrenadante para o tubo da fração solúvel. Ao fim foi adicionado 5 mL de água destilada para ressuspender o precipitado, fração insolúvel. Ao sobrenadante, foi adicionado 36 mL de EtOH P.A gelado para precipitação dos polissacarídeos solúveis, centrifugados a 9000 RPM por 10 min 4°C e o sobrenadante descartado. O solúvel em álcali foi obtido a partir de 500 µL da fração insolúvel em microtubo de 1,5mL de peso conhecido, centrifugados a 14000 RPM por 10 min a 4° C, e o precipitado foi colocado em dessecador para secagem. Após secagem, o microtubo foi pesado e adicionou-se 300 µL de NaOH 1M para cada mg de material seco para extração dos polissacarídeos solúveis em álcali. Os tubos foram incubados por 2h a 37°C com agitações esporádicas em vórtex, centrifugados a 14000 RPM por 10 min 4°C, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Esse procedimento foi realizado 2 vezes e os sobrenadantes unidos. A quantidade de polissacarídeos (solúvel em água, insolúveis, e solúveis em álcali) foi determinada por ensaios colorimétricos pelo método fenol-sulfúrico conforme detalhado por Koo e colaboradores (2003).

#### 4.9.6. Queda de pH (via glicolítica)

Os biofilmes de *S. mutans* ATCC 700610 foram formados e tratados como descrito. Ao sexto dia os biofilmes foram lavados em solução de sais balanceada (salt solution 50mM KCl + 1mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O pH 7,0), por três vezes, posteriormente colocados em becker com 10,8 mL dessa mesma solução, incubados por 1 hora (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após a incubação, o pH foi corrigido para 7,2 com solução 100 mM KOH + 50mM KCl ou 10 mM KOH + 50mM KCl . Quando o pH estabilizou (pH=7,2), foram adicionados 1,2 mL de glicose a 10% e o pH verificado nos tempos 0, 15, 30, 45 minutos, 1 e 2 horas (BELLI; BUCKLEY; MARQUIS, 1995).

#### 4.9.7. Permeabilidade das células dos biofilmes a prótons



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

#### 4.9.8. Extração e quantificação de DNA extracelular (eDNA)

Os procedimentos foram realizados de acordo com (KLEIN et al., 2010) com algumas modificações como descrito a seguir. Os biofilmes foram lavados em solução salina 0,9%, removidos em tubos falcon contendo 2 mL da mesma solução e sonicados. A cada tubo foi adicionado 1mL de PBS 1X, misturados em vórtex e extraídos uma vez com um volume igual de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24 :1) tamponado pH 8,0, centrifugados por 10 min a 5500g, seguido por outra extração com clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa de cada amostra foi misturada com 3 volumes de EtOH. gelado e armazenado a -20 °C. No dia seguinte, o DNA precipitado com etanol foi coletado por centrifugação por 20 min a 4 °C e 14.000 rpm, e dissolvido em 100 µl de tampão TE. A quantidade de eDNA foi determinada espectrofotometricamente com o NanoDrop (Thermo Scientific, Reino Unido) na DO<sub>260</sub> / DO<sub>280</sub> , e a concentração média de DNA foi determinada a partir de três experiências independentes.

#### 4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis foram testadas para distribuição normal e variância homogênea. Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e os dados com distribuição normal utilizou-se o teste paramétrico ANOVA, seguido pelo pós teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Dados com distribuição não normal foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de múltiplas comparações de Dunn's. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism (5.01).

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDRÉ, C. B. et al. Modulation of *Streptococcus mutans* virulence by dental adhesives containing anti-caries agents. **Dental Materials**, v. 33, n. 10, p. 1084–1092, out. 2017.
- BAKER, J. L.; FAUSTOFERRI, R. C.; QUIVEY, R. G. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans* -the more we know, the more we don't. **Molecular Oral Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 107–117, abr. 2017.
- BANAS, J. A. et al. G LUCAN - BINDING P ROTEINS OF THE O RAL S TREPTOCOCCI. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14(2), p. 89–99, 2003.
- BÁRBARA, I. et al. Fitoterapia Na Odontologia : Levantamento Dos Principais. **Psicologia E Saúde Em Debate**, v. 4, p. 71, 2018.
- BARBIERI, D. D. S. A. V. et al. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 624–631, 2007.
- BELLI, W. A.; BUCKLEY, D. H.; MARQUIS, R. E. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 785–791, 1 set. 1995.
- BENDER, G. R.; SUTTON, S. V; MARQUIS, R. E. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 2, p. 331–338, 1986.
- 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.
- CALLAWAY, J. . et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 3, p. 243–256, jun. 1999.
- CAMARGO-RICALDE, S. L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México Sara. **REVISTA DE BIOLOGÍA TROPICAL**, v. 48, n. 4, p. 939–954, 2000.
- CARNEIRO, F. M. et al. TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais** –

**UEG/Câmpus de Iporá**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

CASTILLO PEDRAZA, M. C. et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. **Biofouling**, v. 33, n. 9, p. 722–740, 21 out. 2017.

CHEN, L. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 857–867, 3 jan. 2016.

COZZI, N. V et al. Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 12, p. 1591–1599, 12 dez. 2009.

CRUZ, M. P. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Mimosa hostilis* BENTH. p. 205, 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

CRUZ, M. P. et al. Antinociceptive 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. e0150839, 8 mar. 2016.

CURY, J. A. et al. Biochemical Composition and Cariogenicity of Dental Plaque Formed in the Presence of Sucrose or Glucose and Fructose. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p. 491–497, 2000.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114–122, fev. 2003.

DE SOUZA ARAÚJO, E. et al. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 85–96, jan. 2018.

DEAN, J. G. et al. Biosynthesis and Extracellular Concentrations of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in Mammalian Brain. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9333, 27 dez. 2019.

DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. Physical and Biochemical Studies of *Streptococcus mutans* Sediments Suggest New Factors Linking the Cariogenicity of Plaque with its Extracellular Polysaccharide Content. **Journal of Dental Research**, v. 67, n. 6, p. 890–895, jun. 1988.

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 & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527–531, 2003.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil : Pharmacological studies , drug discovery , challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

FERREIRA MACEDO, J. G. et al. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–28, 2018.

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

FIRMO, W. DA C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, v. 18, 2012.

FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 11 set. 2016.

FONTANILLA, D. et al. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. **Science**, v. 323, n. 5916, p. 934–937, 13 fev. 2009.

FOZO, E. M.; QUIVEY, R. G. Shifts in the Membrane Fatty Acid Profile of Streptococcus mutans Enhance Survival in Acidic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 929–936, fev. 2004.

GAUJAC, A. **Estudos sobre o psicoativo N , N -dimetiltryptamina ( DMT ) em Mimosa tenuiflora ( Willd .) Poiret e em bebidas consumidas em contexto religioso.** [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2013.

GOMEZ, J. Detection and diagnosis of the early caries lesion. **BMC Oral Health**, v. 15, n. S1, p. S3, 15 dez. 2015.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE ALGUMAS ÁRVORES NATIVAS. **Arq. Inst. Biol**, v. 72, n. 3, p. 353–358, 2005.

GRÜNEWALD, R. DE A. Toré e jurema: emblemas indígenas no nordeste do Brasil. **Ciênc. cult. (São Paulo)**, v. 60, n. 4, p. 43–45, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. Plantas medicinais do curso de plantas medicinais. In: **Plantas medicinais do curso de plantas medicinais**. [s.l: s.n.]. p. 241.

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178, 8 dez. 2017.

IBÁÑEZ DE ALDECOA, A. L.; ZAFRA, O.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1390, 26 jul. 2017.

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(4), p. 380 –387, 2017.

KLEIN, M. I. et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* Transcriptome in Response to Starch and Sucrose during Biofilm Development. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13478, 19 out. 2010.

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

KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt -farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782–789, 2003.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510–543, 1 set. 2014.

LEMOS, J. A. et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, p. 435–448, 11 jan. 2019.

LIAO, S. et al. *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the

Protein Secretion Machinery. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 13, p. 2355–2366, 1 jul. 2014.

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

LIMA, O. G. Observações sobre o “Vinho da Jurema” utilizado pelos índios Pancarú de Tacaratu (Pernambuco). **Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, v. 4, p. 45–86, 1946.

LIU, Y. et al. Anti-biofilm Activities from *Bergenia crassifolia* Leaves against *Streptococcus mutans*. **Front. Microbiol.**, v. 8, n. September, p. 1–10, 2017.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353–380, 1986.

LYNCH, D. J. et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. **FEMS Microbiol Lett**, v. 268, n. 2, p. 158–165, 2007.

MAIA, V. C. et al. Two new species of *Lopesia* Rübsaamen (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Mimosa hostilis* (Mimosaceae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 4, p. 578–583, 2010.

MARCEL, S. N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of the hydroethanol extract and fractions of the bark of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 39, p. 823–831, 2016.

MASKE, T. T. et al. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. **Biofouling**, v. 33, n. 8, p. 661–675, 14 set. 2017.

MATHUR, V. P.; DHILLON, J. K. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 85, n. 3, p. 202–206, 23 mar. 2018.

MATSUMOTO-NAKANO, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 1, p. 22–29, fev. 2018.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. L. In vitro pharmacological properties of some extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). **Archivos de investigación medica**, v. 21, n. 2, p. 163–169, abr. 1990.

MONTEIRO, M. H.; FRAGA, S. FITOTERAPIA NA ODONTOLOGIA: LEVANTAMENTO

DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL PARA SAÚDE BUCAL. **Revista Fitos**, v. 9, n. 4, p. 265–268, 2015.

MORI, S. A. et al. Manual de manejo do herbário fanerogâmico. **CEPLAC, Ilhéus**, 1988.

NERY MONÇÃO, N. B.; QUIRINO ARAÚJO, B.; AS GRAÇAS LOPES CITÓ, A. M. D. Exploring the Chemistry of Natural Products and Biological Properties of Mimosa Linnaeus Genus (FABACEAE-MIMOSOIDADE). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 970–1010, 2019.

NOMURA, R. et al. Contribution of Severe Dental Caries Induced by Streptococcus mutans to the Pathogenicity of Infective Endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 7, 20 abr. 2020.

NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos , avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de Mimosa paraibana Barneby ( Mimosaceae ). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718–723, 2008.

OHSAKI, A. et al. Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from Mimosa hostilis. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 54, n. 12, p. 1728–1729, 2006.

OLIVEIRA, E. DE et al. Estrutura anatômica da madeira e qualidade do carvão de Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir. **Revista Árvore**, v. 30, n. 2, p. 311–318, abr. 2006.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466–476, set. 2007.

PEGORARO, J. et al. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. **J Oral Invest**, v. 3, n. 1, p. 33–37, 2014.

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

PHILIP, N.; SUNEJA, B.; WALSH, L. Beyond Streptococcus mutans: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. **British Dental Journal**, v. 224, n. 4, p. 219–225, 16 fev. 2018.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17030, 21 dez. 2017.

RAMIRES, I.; BUZALAF, M. A. R. A fluoretação da água de abastecimento público e seus benefícios no controle da cárie dentária: cinquenta anos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 4, p. 1057–1065, ago. 2007.

RIBEIRO, C. C. C. et al. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 44–50, 2005.

RODRIGUES, J. Z. DE S. et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 104063, maio 2020.

SAXENA, P. et al. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 3–12, 21 mar. 2019.

SCHENKEL, E. P. Cuidado com os medicamentos: As plantas medicinais, os chás e os fitoterápicos. **Porto Alegre: Saga, Delluzzata**, 1995.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 51–59, jan. 2007.

SILVEIRA, P. F. DA; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618–626, dez. 2008.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO**. 6<sup>a</sup> ed. ed. Porto Alegre-RS: Editora da UFRGS, 2007.

SOUZA, R. S. O. DE et al. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 937–947, out. 2008.

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Ciência e Cultura**, v. 59, n. 1, p. 12–13, 2007.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. **Caries Research**, v. 42, n. 6, p. 409–418, 2008.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The Role of Bacteria in the Caries Process. **Journal of Dental**



**Research**, v. 90, n. 3, p. 294–303, 5 mar. 2011.

TANNER, A. C. R.; KRESSIRER, C. A.; FALLER, L. L. Understanding Caries From the Oral Microbiome Perspective. **Journal of the California Dental Association**, v. 44, n. 7, p. 437–46, jul. 2016.

TELLEZ, P. J.; DUPOY DE GUITARD, J. Pharmaceutical preparation containing *Mimosa tenuiflora* extract with skin-regenerating properties. **Patent Eur Pat Appl**, v. 349, p. 469, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. In: **10ª Edição**. [s.l.: s.n.].

VINCENT, L. L.; OTTO, C. M. Infective Endocarditis: Update on Epidemiology, Outcomes, and Management. **Current Cardiology Reports**, v. 20, n. 10, p. 86, 16 out. 2018.

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

WORLD FLORA ONLINE. **WFO (2020): Mimosa**. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000024328>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?ua=1>>.

YAMASHITA, Y. et al. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3811–3817, 1993.

ZIPPEL, J.; DETERS, A.; HENSEL, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 391–396, 2009.

## **6. CAPÍTULO I**

**Antimicrobial activity and bio-guided chemical analysis of the ethanolic extract of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves, dichloromethane fraction and Sorbifolin against *Streptococcus mutans***

Rafael Silva Almeida<sup>1</sup>, Brenda Oliveira Lima<sup>1</sup>, Nayara Silva de Macêdo Neres<sup>1</sup>, Louise Soares Pita<sup>1</sup>, Iago Almeida Santos<sup>1</sup>, Paulo Henrique Santana Silveira<sup>1</sup>, Isabella Porto Santos<sup>1</sup>, Luccas de Oliveira Negrão Ricardo<sup>1</sup>, Jeisa Zielle de Souza Rodrigues<sup>1</sup>, Manuela Ribeiro Passos<sup>2</sup>, Lucas Miranda Marques<sup>1</sup>, Mariluze Peixoto Cruz<sup>1</sup>, Regiane Yatsuda<sup>1\*</sup>.

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

2 State University of Southwest Bahia, Jequié Campus, José Moreira Sobrinho Avenue - Jequiezinho, Jequié - Bahia, Brazil.

\* Correspondence:

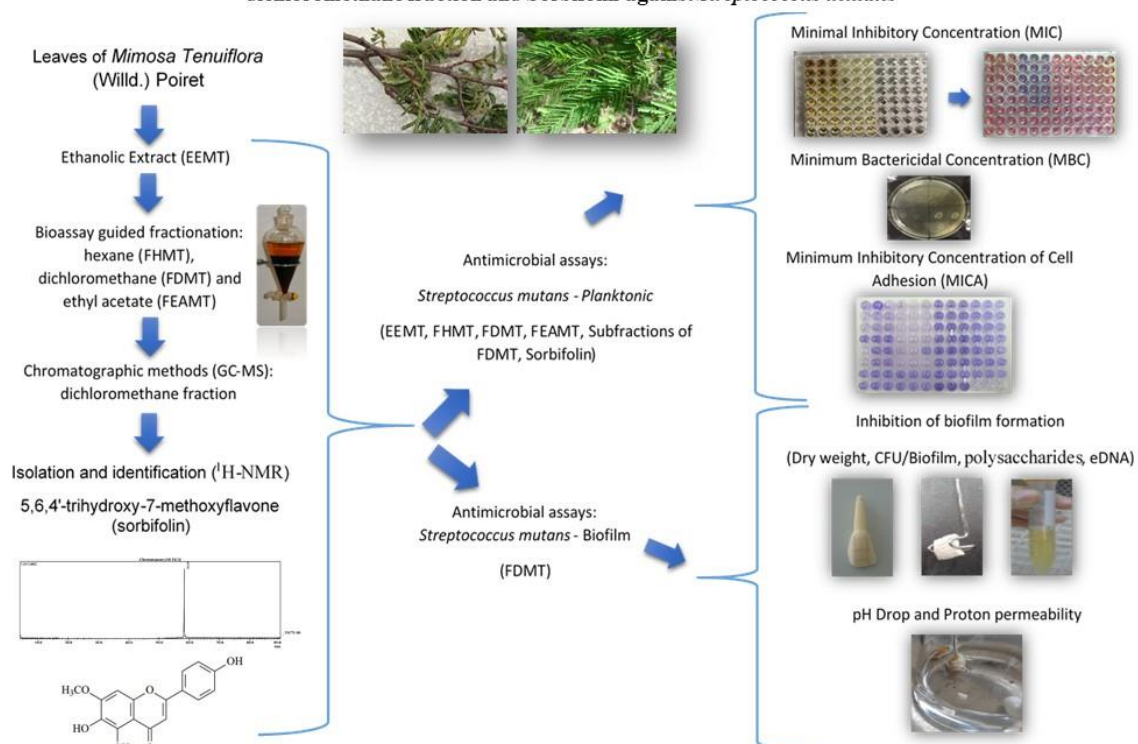
Regiane Yatsuda.

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

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

## Graphical Abstract

**Antimicrobial activity and bio-guided chemical analysis of the ethanolic extract of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves, dichloromethane fraction and Sorbifolin against *Streptococcus mutans***



**Highlights**

- *Mimosa tenuiflora* leaves have several compounds with antimicrobial activity.
- Ethanolic extract have antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*.
- Dichloromethane subfractions have antimicrobial activity against *S. mutans*.
- Dichloromethane fraction reduced virulence factors of *S. mutans* in biofilms.
- First report of Sorbifolin showing bacteriostatic activity against *S. mutans*.

## ABSTRACT

*Mimosa tenuiflora* is popularly known as “black jurema”, widely distributed in northeastern Brazil, and used in many communities to treat various diseases. *Streptococcus mutans* is gram-positive microorganism that form pathogenic biofilms and the main etiological agent associated with the development of dental caries. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity in a bioguided study of fractionation of the ethanolic extract of *M. tenuiflora* leaves (EEMT) and dichloromethane fraction (DFMT) against *S. mutans* ATCC 700610 in planktonic and biofilm model. Bioactive compounds in DFMT were identified by GC-MS or <sup>1</sup>H-NMR: ethyl gallate (14.25 %), sorbifolin (4.66 %), gallic acid (3.55 %), lactic acid (3.24 %), palmitic acid, salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid. Other bioactive compounds were also identified in different concentrations and distribution in subfractions: propylene glycol, lactic acid, oxalic acid, R-(3) hydroxybutyric acid, vanillic acid and protocatechuic acid. EEMT and DFMT showed antimicrobial activities in planktonic *S. mutans* (EEMT: MIC 31.25 µg/mL, MBC 62.5 µg/mL and inhibition of adherence at 15.62 µg/mL; DFMT: MIC 15.62 µg/mL, MBC 31.25 µg/mL and M at 7.875 µg/mL). DFMT in mature biofilms of *S. mutans* decreased CFU/biofilm, soluble and insoluble polysaccharides and levels of eDNA, and also reduced the acid production and the proton permeability of the *S. mutans* cell membrane. Sorbifolin showed only bacteriostatic activity against *S. mutans* and was identified in DFMT and in subfractions. DFMT has several bioactive compounds that act synergistically to inhibit the formation of cariogenic biofilm, presenting antimicrobial activity and inhibiting important *S. mutans* virulence factors. This is the first report of sorbifolin identified in *M. tenuiflora* leaves showing bacteriostatic activity against *S. mutans*. Thus, *M. tenuiflora* is a promising source for the development of new herbal medicines and phytopharmaceuticals with anti-plaque and /or anti-caries activities, and further studies *in vivo* should be carried out in the future.

**KEYWORDS**

*Mimosa tenuiflora*; Fabaceae; antimicrobial, antibiofilm, anticariogenic, 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone, dichloromethane fraction

## 1. Introduction

As a highly prevalent multifactorial disease, dental caries afflicts a large proportion of the world's population (Gao et al., 2016). Dental caries involves interactions between the tooth structure, the microbial biofilm formed on the tooth surface and sugars, as well as salivary and genetic influences (Pitts and Zero, 2016). *Streptococcus mutans* is a gram-positive, facultative anaerobic pathogen (Hamada and Slade, 1980) and is mostly known for its importance in the aetiology of dental caries and occasional association with subacute infective endocarditis (Lemos et al., 2013). It has been largely accepted that the cariogenic potential of *S. mutans* resides in three core attributes: (i) the ability to synthesize large quantities of exopolysaccharides (EPS) of glucan from sucrose that aid initial attachment, colonization and accumulation of hard surfaces and in the development of the extracellular polymeric matrix, (ii) the ability to transport and metabolize a wide range of carbohydrates into organic acids (acidogenicity), and (iii) the ability to thrive under environmental stress conditions, particularly low pH (aciduricity) (Lemos et al., 2019; Lemos and Burne, 2008).

EPS are mainly glucans produced by glucosyltransferases (Gtfs) that provide binding sites for microorganism agglomeration on the tooth surface and formation of pathogenic biofilms, building a physical barrier to macrophages, phagocytes as well as antimicrobial substances (Pitts et al., 2017). Moreover, *S. mutans* are great producers of adhesion proteins and extracellular DNA, components that form and stabilize biofilm, which in turn is a protected and complex microenvironment capable of maintaining active metabolism through the possibility of accessing nutrients and water, promoting resistance to antimicrobials and the spreading of microorganisms (Chen et al., 2016; Lemos et al., 2019).

Thus, if the biofilm had been disorganized, the mineral loss on tooth surface would stop and the carious lesion would be arrested (Abou Neel et al., 2016). Some researchers suggest interventions that aim only to inhibit virulence factors without killing bacteria, such as action on components of the biofilm matrix or acid production, which could minimize the causes of resistance (André et al., 2017). The reference antibiotic used in health conditions that affect the oral cavity is the 0.12% chlorhexidine gluconate. Although it is known as the gold standard, this medication has a series of adverse effects on



tissues, such as the darkening of teeth and tongue, loss of taste, pain, and unpleasant taste (Pegoraro et al., 2014).

Plant extracts have been utilized for centuries in the name of human health and have traditionally provided a source of new compounds and numerous clinical studies have proved the therapeutic value of these molecules (Abreu et al., 2012). *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret (also known as *Mimosa hostilis* (Mart.) Benth and *Acacia hostilis* Benth.) is a plant of the Fabaceae family and is popularly known as “jurema preta” in Brazil (Cruz et al., 2016). *M. tenuiflora* is a shrub/tree that is distributed in abundance among the states of Northeast Brazil, especially in the Caatinga region (Bezerra et al., 2011). In traditional medicine, the plant has anti-inflammatory (Cruz et al., 2016), antioxidant, healing, and antimicrobial properties (Amariz et al., 2020; Lozoya et al., 1989; Padilha et al., 2010).

In this context, the objective of this work was to evaluate the phytochemistry and antimicrobial activity of the ethanolic extract, fractions and the isolated compound sorbifolin from the leaves of *M. tenuiflora* on planktonic cells and in a biofilm model of *S. mutans*.

## 2. Results and discussion

The qualitative phytochemical analysis of *M. tenuiflora* revealed the presence of alkaloids, steroids, flavonoids, polyphenols, saponins and tannins in ethanolic extract of *M. tenuiflora* (EEMT), dichloromethane fraction (DFMT) and subfractions D5 and D6. Only phenolic acids were not found in the samples. Saponins, flavonoids and tannins were identified in the stem bark extract of *M. tenuiflora* (Amariz et al., 2020), and these chemical classes are known for their antimicrobial activity (Simões et al., 2007). The yield obtained for EEMT and fractionation are described in Table 1. EEMT yield was 15.97 % and the fraction with better yield was DFMT (59.32 %), and for subfraction it was D6 (62.42 %).

EEMT demonstrated significant inhibitory (MIC 31.25 µg/mL) and bactericidal (MBC at 62.5 µg/mL) activities against planktonic *S. mutans* (Table 1), and also inhibited the adherence of *S. mutans*

(MICA 15.75  $\mu\text{g/mL}$ ). Fabry et al., (1998) defined active crude extracts as those having MIC values < 8000  $\mu\text{g/mL}$ . Ríos and Recio, (2005) proposed that antimicrobial activity would be very interesting for crude extracts and isolated compounds if the MICs were 100  $\mu\text{g/mL}$  and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Furthermore, phytochemicals are routinely classified as antimicrobials when susceptibility tests had MICs in the range of 100–1000  $\mu\text{g/mL}$  (Simões et al., 2009). Thus, EEMT in this study can be considered of great activity and promising for the isolation of active compounds. Maria et al., (2018) also showed that the bark extract *M. tenuiflora* have antimicrobial activity against *S. mutans* in the diffusion method in solid medium (MIC 3.9 mg/mL), and also inhibited the cell adhesion (MICA 125 mg/mL). Aqueous extract of the cortex of *M. tenuiflora* showed  $\text{IC}_{50}$  at 43  $\mu\text{g/mL}$  in agar dilution method with *S. mutans*, reducing its viability in 80% at 500  $\mu\text{g/mL}$  (Vargas-Segura et al., 2020).

The bioguided method consists of performing antimicrobial tests together with chemical analysis, each subfraction is obtained and tested for antimicrobial activity, and with a positive result, a new partition is performed only for the active subfraction. Then, the EEMT partition was performed and the three fractions obtained were tested. HFMT did not show MIC, MBC or MICA at the highest concentration tested of 1000  $\mu\text{g/mL}$  for *S. mutans*. EAFMT showed good results with MIC at 62.5  $\mu\text{g/mL}$  and MBC at 250  $\mu\text{g/mL}$ . The best antimicrobial results were obtained by DFMT that showed MIC and MBC at 15.62 and 31.25  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, half of the concentrations obtained with EEMT. Considering these results and the good yield of DFMT, this fraction was chosen for the biofilm tests, for fractionation and identification of the active compounds. The inhibition of adherence of *S. mutans* was obtained at sub-MIC concentrations with DFMT (7.875  $\mu\text{g/mL}$ ) and FEAMT (62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), corroborating with the study that showed inhibition of adherence of *S. mutans* by hydroalcoholic extract from the bark of *M. tenuiflora* at 125 mg/mL (Maria et al., 2018). The adherence of *S. mutans* is an important virulence factor and the first step in the formation of biofilms (Rodrigues et al., 2020).

Then, subfractions of DFMT were made. The subfractions D1, D2, D3, D4, D5 and D6 showed MIC values between 31.25 and 500  $\mu\text{g/mL}$ . Lower MIC values were obtained with D5 and D6 (31.25  $\mu\text{g/mL}$ ), and only D5 and D6 subfractions showed bactericidal activities (MBC 62.5 and 250  $\mu\text{g/mL}$ ,

respectively). Thus, D5 and D6 were selected for fractionating and for the phytochemicals studies. The subfractions D5.1, D5.3, D5.4, D5.13, D5.15 e D6.1 did not show antimicrobial activity at the highest concentration tested (1000 µg/mL). The lower MIC and MBC values were obtained with D5.14 (15.62 and 62.5 µg/mL, respectively); followed by D6.7 and D6.8 (MIC 31.25 µg/mL and MBC 62.5 µg/mL). None of the subfractions (D1 to D6) were able to inhibit cell adhesion, and the subfractions of D5 and D6 were not tested due to insufficient quantity to perform the test

Phytochemical analysis of EEMT and DFMT have been shown to be rich in compounds with antimicrobial activities. The bioactive compounds identified in DFMT account for 30.47% of the total compounds in the fraction, and even in lower concentrations, they may be important for their antimicrobial and anti-adherence activity, acting synergistically with different mechanisms of action. The DFMT compounds that have antimicrobial activities described in the literature were (Table 2): ethyl gallate (14.25 %), sorbifolin (4.66 %), gallic acid (3.55 %), lactic acid (3.24 %), palmitic acid (1.42 %), salicylic acid (0.23 %) and 4-hydroxybenzoic acid (0.22 %). In subfractions D5 and D6, ethyl gallate was the major compound (8.36% for D5 and 6.43% for D6); and lactic acid was identified in lower concentrations (0.31 and 0.65%). 4-hydroxybenzoic acid (1.46%) and palmitic acid (0.28%) were only in D5, and gallic acid was identified only at D6 (2.38%). These compounds in D5 and D6 described before were also presented in higher concentrations in DFMT, except the hydroquinone, only present in D5 and D6.4. Ethyl gallate has bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* (Vandal et al., 2015) and *S. mutans* (MIC 1.56 mg/mL) (Gabe et al., 2019). Gallic acid has antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *S. mutans* with MIC at 1.2 and 8 mg/mL, respectively (Cai and Wu, 1996; Castillo Pedraza et al., 2017; Sendamangalam et al., 2011). Gallic acid was also identified in the aqueous extract of *M. tenuiflora* (Amariz et al., 2020). Our group in another study demonstrated that gallic acid and ethyl gallate have MIC at 250 µg/mL and did not showed bactericidal effect for *S. mutans* ATCC 25175 (Passos et al., 2021). Kang et al. (2008) demonstrated inhibition of adherence of *S. mutans* Ingbritt with gallic acid at 2-4 mg/mL, and Wu et al., (2015) with 1 to 4 mg/mL. Latic acid has antimicrobial activity against *E. coli* (Byakika et al., 2019), and can help to inhibit the growth of other non-aciduric

bacteria by lowering the pH. Palmitic acid has antimicrobial activity against Gram-negative bacteria (Huang et al., 2011). 4-Hydroxybenzoic acid has antimicrobial activity against a range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *S. mutans* (CHO et al., 1998). In other studies, salicylic acid inhibited the activity of glucosyltransferases enzymes (GTFs) of *S. mutans*, an important virulence factor responsible for the production of exopolysaccharides from dietary sucrose, which allow the microorganism agglomeration on the tooth surface and formation of pathogenic biofilms (Ham and Kim, 2020; Kuhnert et al., 2004).

Analyzing the subfractions of D5 and D6, D5.14 showed the best results for MIC and MBC (15.62 and 62.5 µg/mL, respectively), followed by D6.7 and D6.8 (MIC 31.25 and MBC 62.5 µg/mL). The subfractions of DFMT (D1 – D6) lost the ability to inhibit the adhesion of *S. mutans*, probably due to the quantitative and qualitative differences of the compounds distributed among them. The chemical composition of the subfractions varied considerably, showing a diversity of heterogeneously distributed bioactive compounds. In D5.14, three antimicrobial compounds were also identified in lower concentration at DFMT and in D5, ethyl gallate (0.07%), lactic acid (0.06%), and salicylic acid (0.15%), and in higher concentration: 4-Hydroxybenzoic acid (2.52%). In addition, bioactive compounds were identified at D5.14 and were not in DFMT: propylene glycol (0.24%), oxalic acid (0.20%); vanillic acid (0.25) and protocatechuic acid (0.12%). Propylene glycol is a known antimicrobial compound (Kinnunen and Koskela, 1991) and has bactericidal activity against *S. mutans*, *E. faecalis* and *E. coli* (Nalawade et al., 2015). Oxalic acid has bacteriostatic activity against *E. coli* (Kumar et al., 2018; Kwak et al., 2016) and *B. subtilis* (Kwak et al., 2016). Vanillic acid has antimicrobial activity against *Enterobacter hormaechei* (QIAN et al., 2020) and *S. aureus* MRSA (Keman and Soyer, 2019). Protocatechuic acid (PCA) is a broad-spectrum antimicrobial agent (Ajiboye et al., 2017), including activity against *S. aureus* MRSA and *Pseudomonas aeruginosa* (Jalali et al., 2020); and *S. mutans* (Almeida et al., 2012). Analyzing the presence of the bioactive compounds in D6.7 and D6.8, lactic acid is the only compound identified in both subfractions and identified in DFMT at higher concentrations.

In D6.8, it was also identified ethyl gallate (0.82%) and gallic acid (1.11%), and in D6.7, the sorbifolin (3.8%).

Sorbifolin was a pure compound isolated in D6.6.1 subfraction. The compound was identified by <sup>1</sup>H-NMR as the flavonoid 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone or sorbifolin (Figure 1), as can be seen in the Total ion chromatogram of the D6.6.1 subfraction (Figure 2). Sorbifolin is a polyphenolic product of the secondary metabolism of the plants, and our group had already identified sorbifolin in the leaves of *M. tenuiflora* (Cruz et al., 2016). Sorbifolin showed MIC at 125 µg/mL and no bactericidal activity or inhibition of *S. mutans* adherence. Sorbifolin was identified in DFMT (4.66 %), D5.8 (17.05 %), D6.6 (31.31 %), D6.7 (3.8 %) and D5.8.1 (73.37 %). This is the first report of Sorbifolin showing antimicrobial activity against *S. mutans*. Antimicrobial activity of Sorbifolin was reported against *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis* and *E. coli* (Zhanzhaxina et al., 2020). Sorbifolin also possess anti-inflammatory, antiviral, antidiabetic, and antioxidant activities (Fernandes et al., 2008; Shimizu et al., 2017; Singh et al., 2019; Zhanzhaxina et al., 2020).

Biofilms are defined as aggregates of microorganisms in which the associated cells are frequently embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances (EPS) that are adherent to each other and/or a surface (Flemming et al., 2016). Biofilms can act as a barrier that prevents the flow of antibiotics, and microbial cells within biofilms have shown 10–1000 times more antibiotics resistance than the planktonic cells (Mah, 2012). The influence of DFMT treatment in *S. mutans* biofilm was evaluated in two concentrations: 3.125 mg/mL (DFMT3.125) and 6.25 mg/mL (DFMT6.25), 100 and 200-fold concentration of MBC (Table 3). DFMT6.25 showed bactericidal activity against *S. mutans* in the biofilm, reducing the viable cells, similar to the treatment with chlorhexidine 0.12% ( $p < 0.05$ ), the positive control. DFMT3.125 was unable to show antimicrobial activity. The reduction of viable cells is especially important, since the decrease in microbial density has disadvantages in the intercellular communication and reduces the commands for producing matrix components (Chen et al., 2016; Lemos et al., 2019). DFMT can affect the formation of biofilm interfering in the micro-colony

formation, disrupting biofilm architecture, enhancing the penetration of antimicrobials; that affects biofilm maturation and can induce its dispersion and degradation (Rasamiravaka et al., 2015).

Based on the data obtained from the phytochemical analysis of DFMT, the reduction of viable cells in the biofilm by DFMT may be related to the presence of 4-hydroxybenzoic acid, lactic acid, palmitic acid, salicylic acid, sorbifolin, gallic acid and ethyl gallate that showed bacteriostatic or bactericidal activities against *S. mutans* in different studies (Cai and Wu, 1996; Castillo Pedraza et al., 2017; CHO et al., 1998; Gabe et al., 2019; Sendamangalam et al., 2011). Sendamangalam et al., (2011) and Shao et al., (2015) showed that gallic acid (8 mg/mL) inhibited the growth at 24/48 h-old *S. mutans* biofilms. Gallic acid (200 mg/mL) and ethyl gallate (50 mg/mL) reduced viable cells in biofilms of *S. mutans* (Passos et al., 2021).

The total dry weight of the biofilm depends on the microbial density and total biomass of EPS. *S. mutans* utilize the glucose moiety of sucrose as the substrate to synthesize glucose polymers of glucans. Sucrose shows the highest cariogenic potential in dental caries development in the production of exopolysaccharides by glucosyltransferases (GTFs) (Sendamangalam et al., 2011; Shao et al., 2015). GtfB synthesizes water-insoluble glucans rich in  $\alpha(1-3)$ -linkages, GtfC produces a mixture of soluble glucans rich in  $\alpha(1-6)$ -linkages and insoluble glucans, and GtfD makes primarily soluble glucans. These polymers, especially the  $\alpha(1-3)$ - linked water-insoluble glucans, are major constituents of biofilm matrices (Hanada and Kuramitsu, 1989, 1988). DFMT3.125 and chlorhexidine 0.12% reduced the production of soluble glucans ( $p < 0.05$ ); DFMT3.125 and DFMT6.25 and chlorhexidine also reduced the production of insoluble glucans ( $p < 0.05$ ) compared to vehicle biofilms. Soluble glucans in alkali and the total dry weight of the biofilms were not reduced in biofilms treated by DFMT ( $p > 0.05$ ). Only chlorhexidine was able to reduce the total biomass of the biofilm. Thus, the decrease of glucans in biofilm by DFMT was important because water-insoluble glucan binds the bacterium for attachment to the tooth surface, while the water-soluble glucan may supply a source of metabolizable carbohydrate for plaque bacteria, if nutrients become limited (Cross et al., 2007). In addition, DFMT reduce EPS formation, which promote bacterial adhesion to the dental surface, contribute to the structural integrity

of dental biofilms, alter the biofilm porosity and, consequently, increase enamel demineralization. (Koo et al., 2009; Xiao and Koo, 2010).

The following compounds can be responsible for this interesting results of DFMT. Salicylic acid and vanillic acid inhibited the GTFs activity of *S. mutans* by 15.3% and 10.3%, and also inhibited biofilm formation by 43.3% (Ham and Kim, 2020). Salicylic acid is a noncompetitive inhibitor of GTFase activity that acts by modifying enzyme without interacting with the substrate binding site, and gallic acid have been also suggested to be a noncompetitive inhibitor of GTFase (Goyal et al., 2013). Our group demonstrated before that gallic acid (200 mg/mL) and ethyl gallate (50 mg/mL) reduced the levels of glucans soluble in alkali and downregulated expression of *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* genes in biofilms of *S. mutans* (Passos et al., 2021). Sendamangalam et al., (2011) showed that gallic acid promoted a little reduction between 15 and 20% of glucans synthesis by inhibiting GTFs enzymes. Although, Yanagida et al., (2000) showed that gallic acid did not inhibit the GTF enzyme activity until the higher concentration tested (1000 µg/mL). Gabe et al., (2019) showed that ethyl gallate (1.56 to 0.39 mg/mL) promoted an upregulation in gene expression of *gtfC* and *gtfB*, but did not affect *gtfD*.

Another component of biofilm associated with virulence factor in biofilm is extracellular DNA. Treatment with DFMT3.125 and DFMT6.25 were efficient in reducing eDNA production compared to the vehicle ( $p < 0.05$ ) (Table 3). Chlorhexidine 0.12% did not alter the eDNA quantity in relation to the vehicle ( $p > 0.05$ ). Kim et al., (2018) demonstrated that eDNA is important for the formation/maturation and stability of *S. mutans* biofilms formed in the presence of sucrose and starch. The biofilm matrix is composed of a complex array of EPS that is composed of exopolysaccharides, nucleic acids (eDNA, eRNA), proteins, lipids and other biomolecules (Flemming et al., 2016). Programmed cell death and lysis is widely considered the major source of eDNA, which occurs in response to environmental conditions, although there is evidence that growth in biofilms triggers the release of eDNA independently of cell lysis (Liao et al., 2014; Senpuku et al., 2019), as in the protein secretion and membrane insertion pathways (Karygianni et al., 2020; Liao et al., 2014; Nagasawa et al., 2020). Then, DFMT reducing the quantities of eDNA in the biofilm directly affect the biofilm formation

corroborating with the results of reduction of insoluble e soluble glucans, which reflects on the reduction of EPS formation and *S. mutans* adherence. Changes in EPS formation directly affect its functions on biofilm (Dragoš and Kovács, 2017; Koo et al., 2017). Kim et al., (2018) demonstrated that eDNA levels in biofilms are not as closely related to the thickness of EPS in biofilms, but are highly dependent on CFU in biofilms. In this context, DFMT reduced the number of viable cells, reducing the CFU, and thus, contributing to the decrease of eDNA levels.

*S. mutans* is an active sugar consumer and can alter the local environment by forming an EPS-rich and low-pH environment, thereby creating a favorable niche for acidogenic and aciduric species to thrive (Lemos et al., 2019). During the process of glycolysis, enolase catalyzes the production of phosphoenolpyruvate and lactate dehydrogenase catalyzes the production of lactic acid. The acid produced by these bacteria begins to erode the superficial enamel or outermost dental covering and, if the acid remains in contact with the tooth for a longer time, it causes subsurface demineralization or softening of the tooth in the early stages (Pitts et al., 2017).

In the pH drop test, the acid production of *S. mutans* biofilm was significantly reduced by the action of DFMT3.125 from 30 until 120 min, and chlorhexidine 0.12% reduced acid production during all the test compared to vehicle ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). The final pH at 120 min was 6.83 for chlorhexidine, 5.36 for DFMT3.125 and 4.4 for vehicle, demonstrating the ability of DFMT to reduce acid production and prevent demineralization *in vitro*. According to Kim et al. (2018), the acidogenicity of *S. mutans* biofilms is related to the CFUs, and pH values were inversely proportional to the number of CFUs of *S. mutans* in the biofilms. Therefore, both the reduction of the CFUs and the production of glucans in biofilms treated with DFMT can decrease the production of acid by *S. mutans*.

Furthermore, in pH drop test, the rates of pH drop reflect acidogenic capacities of the cells, while final pH values of the suspensions also reflect acid tolerance capacity- aciduricity (Phan et al., 2004). To thrive at low pH values, *S. mutans* mounts the so-called acid tolerance response, a robust transcriptional and physiologic adaptation mechanism that encompasses the induction of pathways that contribute to cytoplasm buffering and changes in membrane fatty acid composition, ultimately



protecting the cellular machinery from acid damage and contributing to the survival of the bacteria during stress (Baker et al., 2017; Lemos and Burne, 2008). The aciduricity capacity of *S. mutans* was evaluated at proton permeability test (Figure 4). DFMT6.25 only reduced the proton permeability of cell membrane of *S. mutans* at 80, 82 and 120 min compared to vehicle ( $p < 0.05$ ), with final pH at 5.02 for DFMT and 4.85 for vehicle. Chlorhexidine 0.12% reduced the proton permeability in all the times in test compared to vehicle ( $p < 0.05$ ), with final pH at 5.64. After butanol, the rapid increase in pH is an indicative of loss of  $\Delta\text{pH}$  between the cytoplasm and the environment (Passos et al., 2021). *S. mutans* maintain an intracellular pH that is more alkaline than the surrounding environment ( $\Delta\text{pH}$ ) by about 0.5 to 1 pH unit (Lemos et al., 2019). Thus, DFMT has sensitized the cells to acidification, to the point that the final pH values are significantly higher, promoting the interruption of proton permeability on cell membrane, leading to inhibition of intracellular metabolism, including the action of glycolytic enzymes in acid production (Jeon et al., 2011) and structural damage to the cell membrane, proteins and DNA (Passos et al., 2021).

The possible mechanisms to alter the permeability of *S. mutans* membrane is by inactivating the gene *fabM* responsible for biosynthesis of monounsaturated fatty acids, which results in extreme sensitivity to low pH, inability to maintain  $\Delta\text{pH}$ , and reduced virulence (Fozo et al., 2007; Fozo and Quivey, 2004). Another mechanism to alter the permeability of the *S. mutans* membrane is changing pumping protons out of the cell or by generating neutralizing molecules. In *S. mutans*, membrane-bound  $\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$  (F-ATPase) is the main mechanism by which protons are extruded to maintain pH homeostasis.

The reduction of acidogenic and aciduricity of *S. mutans* by DFMT probably were promoted by gallic acid and ethyl gallate. Passos et al. (2021) showed that gallic acid (200 mg/mL) and ethyl gallate (50 mg/mL) reduced the acid production and reduced the acid tolerance of *S. mutans* in biofilms. Gabe et al., (2019) suggested that ethyl gallate inhibited the F-ATPase of *S. mutans*, as it reduced the pH levels. In addition, it is worth mentioning that other unidentified compounds can act synergistically with

the compounds previously described to modulate *S. mutans* virulence factors, being *M. tenuiflora* leaves a promising source for the development of new anti-caries / anti-plaque agents.

### 3. Conclusion

*Mimosa tenuiflora* is a promising plant for therapeutic indication in the dental clinic, as its ethanolic extract, fractions and subfractions have bacteriostatic and bactericidal activity against planktonic *S. mutans*. In addition, it has several antimicrobial compounds in its composition, such as sorbifolin, which we have demonstrated for the first time in the literature its bacteriostatic activity against planktonic *S. mutans*. The dichloromethane fraction not only reduced the cell viability of *S. mutans* in biofilm, but also reduced the levels of eDNA, soluble and insoluble polysaccharides that are directly involved in the formation of the extracellular matrix, which provides bacterial adhesion, aggregation, accumulation and increase in biofilm biomass that promote resistance to antimicrobials and host defense. In addition, the dichloromethane fraction reduced the acidogenicity and acidity of *S. mutans* in biofilms, which promote enamel demineralization through the production of acids and favor the predominance of acid-tolerant bacteria in the environment. Thus, the fraction of dichloromethane, by weakening the cariogenic biofilm, can reduce enamel demineralization, predisposing factors for the development of dental caries, and it is necessary to confirm these pharmacological activities in future studies *in vivo*.

### 4. Experimental

#### 4.1. General experimental procedures

TLC was performed using pre-prepared silica gel 60 (0.25 mm silica gel F254 with UV254 nm fluorescence indicator, Merck), using CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (7: 3) as the mobile phase and were revealed by employing iodine fumes and UV light (254/366 nm). 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- MS system was 290 °C. The initial temperature of the analysis was 80 °C for 5 min, increasing from 285 °C at a rate of 4 °C/min and the final temperature remained at 285 °C for 40 min. 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). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III Spectrometer operating at 500 MHz (<sup>1</sup>H) and 125 MHz (<sup>13</sup>C), using (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO as a deuterated solvent with a purity level greater than 99.8%, of the Aldrich® brands. The spectrum signals were recorded based on the solvent used in relation to the TMS.

#### **4.2. Plant material**

The leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret was collected (IBAMA's license # N 12292-1 and 13258-1) in the National Forest Contendas do Sincorá (S13°55'23.2" and W041°07'05.0", at 374 m height) situated in the municipality of Contendas do Sincorá, Bahia State, Northeast Brazil. The plant material was identified by Prof. Avaldo de Oliveira S. Filho, and voucher specimens (n° HUESBVC 4907, 4980 and 4993) were deposited in the Herbarium of Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. The activity was registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) (N° A7125E9).

#### **4.3. Preparation of the extracts, fractions and subfractions**

The methodology for preparing the extracts was described by Cruz et al. (2016) and Cechinel Filho et al. (1998). The ethanolic extract was prepared from dried leaves (780 g) at room temperature and ground. Exhaustive maceration was carried out with ethanol (EtOH) 99° GL, under sporadic stirring for 72 hours. After filtration, the extracts were concentrated on a rotary evaporator at 45 °C until the elimination of EtOH, and dried in a drying oven at 45 °C, obtaining the ethanolic extract of *M. tenuiflora* (EEMT).

Then, 81 g of EEMT was solubilized in an EtOH/ H<sub>2</sub>O mixture (1:1), added to a separating funnel and sequentially partitioned (liquid-liquid extraction), with solvents (3 x 300 mL) in increasing order of polarity, hexane (HEX), dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtOAc). Solvent evaporation was carried out on the rotary evaporator and dried at 45 °C, providing the fractions of hexane (HFMT), dichloromethane (DFMT) and ethyl acetate (EAFMT). These three fractions were subjected to antimicrobial tests. In the biological tests, the DFMT fraction (4.5 g) showed the best results, and then, was fractionated by dry column chromatography, using cellulose membrane (55 cm) filled with silica gel 60 (70-230 mesh, Merck) as a stationary phase. The mobile phase consisted of a mixture of chloroform (CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc, 7: 3). After the complete elution of the DFMT, the column was sectioned in 9 parts according to the color profile, and were washed with CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc/ Methanol (MeOH) in a Buchner funnel lined with paper filter and collected. The subfractions formed were analyzed using comparative TLC. The subfractions obtained that showed a similar chromatographic profile were grouped and the solvent mixture was evaporated and dried at 45 °C. The subfractions were named D1, D2, D3, D4, D5, D6 and tested in antimicrobial assays.

After the TLC analyzes, the sub-fractions D5 and D6 were chosen to be fractionated by liquid chromatography with silica gel 60 (Merck) because showed good yield and results in antimicrobial tests. 4.5 g of D5 was solubilized in a CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (7: 3), and eluted in this order with the following solvent mixtures: CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (7:3 - 500 mL); CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (6:4 - 300 mL); CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (1:1 - 200 mL); CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (4:6 - 100 mL); CHCl<sub>3</sub>/ EtOAc (3:7 - 100 mL); EtOAc P.A. (100 mL); MeOH (200 mL). Similar aliquots were then joined after analysis using a comparative TLC as previously described, then the solvent was evaporated and dried at 45 °C. 15 subfractions were obtained that received the following denomination: D5.1, D5.2, D5.3, D5.4, D5.5, D5.6, D5.7, D5.8 D5.9, D5.10, D5.11, D5.12, D5.13, D5.15, D5.15. For the D6 (14.1 g), chromatography and analyzes were performed in a similar manner to that described with D-5, except that the solvent mixture used was: CHCl<sub>3</sub> / EtOAc (6:4 - 400 mL); CHCl<sub>3</sub> / EtOAc (1:1 - 300 mL); CHCl<sub>3</sub> / EtOAc (4:6 - 100 mL); EtOAc P.A. (100 mL); MeOH (400

mL). Aliquots were collected and joined by chemical similarity after TLC analysis, which yielded 9 subfractions: D6.1, D6.2, D6.3, D6.4, D6.5, D6.6, D6.7, D6.8, D6.9.

Subfractions D5.8 and D6.6 had yellowish insoluble crystals in the  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  mixture, and were separated by filtration. The subfractions D5.8.1 and D6.6.1 were the insoluble crystals recovered after filtration, D5.8.2 and D6.6.2 were the soluble collected in the solvent mixture. The yield of each extract, fraction, subfractions were calculated and the results were expressed as a percentage of the mass used in each extraction process.

#### **4.4. Phytochemical analysis**

Phytochemical analysis of EEMT, DFMT and subfractions D5 and D6 was performed using TLC method to identify the mainly constituents (REGO, 2012; Simões et al., 2007; Wagner and Bladt, 1996). 10 mg of the extracts were diluted in 1 mL of EtOH and applied to the TLC plates. The solvent systems used were  $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$  (7:3). Phytochemical tests for the presence and identification of alkaloids, steroids, flavonoids, polyphenols, saponins and tannins were carried out using the following dyeing reagents: alkaloids were detected using Wagner's Reagent; steroids with Liebermann-Burchard Reagent; flavonoids with aluminum chloride in 1% (w/v) ethanol; polyphenols with a mixture of aqueous solutions of potassium ferrocyanide 1% (w/v) and iron chloride 2% (w/v); saponins with 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ethanolic solution and tannins with 2%  $\text{FeCl}_3$  methanolic solution (REGO, 2012; Wagner and Bladt, 1996).

#### **4.5. Analysis of dichloromethane fraction and subfractions by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and Identification of isolated compound by nuclear magnetic resonance (NMR)**

The DFMT and the subfractions (D5, D6, D5.8, D5.9, D5.10, D5.11, D5.14, D6.4, D6.6, D6.7, D6.8, D6.9, D5.8.1 and D6.6.1 were analyzed by GC-MS for identification of the compounds as described by Cruz et al., (2016).

D6.6.1 was the soluble part collected in the solvent mixture from D6.6. and it was submitted to NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) analysis for identification. The compound was identified by  $^1\text{H}$ -NMR as the flavonoid 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone or sorbifolin (Figure 1 and 2) with the spectral data: EM m/z (derivatized): 516 [M+]; 501 [M-CH<sub>3</sub>]+ (100%). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)  $\delta\text{H}$  (mult.; J em Hz; H) 13,25 (s; OH); 7,95 (d; 8,6; H-2',6'); 7,03 (d; 8,6; H-3',5'); 6,64 (s; H-3); 6,62 (s; H-8); 3,88 (s, CH<sub>3</sub>O-7). RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, CO(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)  $\delta\text{C}$ : 103,67 (C-3), 94,78 (C-8), 129,35 (C-2',6'), 116,94 (C-3',5'), 161,99 (C-4'), 60,76 (OCH<sub>3</sub>-7) (Figures S1 and S2, Supporting Information).

#### **4.6. Microorganisms and Minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum bactericidal concentration (MBC) and Minimum inhibitory concentration of cell adhesion (MICA)**

*Streptococcus mutans* ATCC 700610 was grown in BHI (Brain Heart Infusion - KASVI) medium at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, for 24 h and stored at – 80 °C. MIC was performed according to the broth dilution method with *S. mutans* ATCC 700610 (Passos et al., 2021; Rodrigues et al., 2020). Serial dilution was performed with the EEMT, fractions, and subfractions to obtain concentrations ranging from 7.875 to 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the tests. For MIC determination, the starting inoculum was  $1\text{-}2 \times 10^8$  CFU/mL. In MIC assay, the inoculum was standardized for the absorbance value of 0.135 to 660 nm in a spectrophotometer, corresponding to the 0.5 Mc Farland scale ( $1\text{-}2 \times 10^8$  CFU/mL). MIC test was performed in 96 wells microplates, in which each well was filled with 190  $\mu\text{L}$  BHI with inoculum (inoculation 1:1000), except the negative control wells. The plates were incubated for 24 hours, at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. In the wells with no visual growth, 20  $\mu\text{L}$  of the resazurin dye (Sigma<sup>®</sup>) was added, and after 20 minutes of incubation, the presence of blue color indicated absence of growth and pink color the presence of bacterial growth. MIC was defined as the lowest concentration of metabolites that inhibit the visible growth of a microorganism. For the determination of MBC, an aliquot (20  $\mu\text{L}$ ) of suspensions from the wells that there was no bacterial growth was inoculated in plates with BHI agar

and incubated for 24 hours, 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C. The MBC was defined as the lowest concentration that enables no growth on the agar (99.9% kill).

In MICA assay, the same procedure of MIC was followed with medium supplemented with 1% of sucrose. The EEMT, fractions, and subfractions were tested with sub-MIC concentrations. After the incubation for 24h, 5% CO<sub>2</sub>, at 37°C, the plates were washed three times with saline solution and stained with 0.1% crystal violet, and followed by another washing for removing dye excess. 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 (Passos et al., 2021; Rodrigues et al., 2020). All the tests were conducted in triplicate at three different times (n = 9).

#### **4.7. Antibiofilm assays with dichloromethane fraction of *Mimosa tenuiflora***

Biofilms of *S. mutans* ATCC700610 were formed on fragments of bovine tooth placed in a vertical position in BHI culture with 1% of sucrose at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 5 days, as described by Rodrigues et al., (2020) and Passos et al., (2021). The starting inoculum was 1-2 x 10<sup>8</sup> CFU/mL. Each tube was filled with 8 mL of BHI with inoculum (inoculation 1:1000), except the negative control tube. The biofilms were grown undisturbed for 24 h to allow initial biofilm formation. At this point (24 h old), the biofilms were treated twice daily until the fifth day of the experiment (120 h-old biofilm) with the DFMT in the concentrations of 3.125 and 6.250 mg/mL, chlorhexidine gluconate 0.12% (positive control) and vehicle (saline 0.9% – negative control). The biofilms were exposed to the treatments for 1 min, double-dip rinsed in a sterile saline solution and transferred to 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) and bacterial viability. The composition of polysaccharides (soluble, soluble in alkali, and insoluble) were determined by colorimetric assays as detailed by Rodrigues et al., (2020) and Passos et al., (2021). The influence of DFMT (3.125 mg/mL) on glycolysis were measured by standard pH drop test as described Rodrigues et al., (2020) and Passos et al., (2021). Proton permeability testing was also performed with DFMT (6.25

mg/mL) on biofilms (Passos et al., 2021; Rodrigues et al., 2020). The tests were performed in three repetitions at three different times (n = 9).

Extracellular DNA (eDNA) extraction was also performed and quantified in biofilms. The assay was performed according to Klein et al., (2010) with some modifications as described below. The biofilms were washed in 0.9% saline, and to each tube 1mL of PBS 1X was added, vortexed and extracted with an equal volume of phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24 :1) buffered at pH 8.0. The solution was centrifuged for 10 min at 5500g, followed by another extraction with chloroform/ isoamyl alcohol (24:1). The aqueous phase of each sample was mixed with 3 volumes of chilled EtOH PA and stored at -20 °C. In the next day, the DNA was precipitated with ethanol and collected by centrifugation for 20 min at 4 °C and 14.000 rpm, and dissolved in 100 µl of TE buffer. The amount of eDNA was determined spectrophotometrically in NanoDrop (Thermo Scientific, United Kingdom) at DO 260/280 nm, and the average of DNA concentration was determined from three independent experiments (n = 9).

#### **4.8. Statistical analysis**

For the data with non-parametric distribution, the statistical comparisons between groups were made using Kruskal-Wallis test, comparing all pairs with Dunn's Multiple comparison. In the pH drop and Proton permeability assays, statistical comparisons between groups were made using Two-way ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni's test. The level of significance was set at 5%. Data was analyzed using Graphpad Prism software (5.01).

#### **COMPETING INTERESTS**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are also very grateful to all student volunteers who took part in this study and to Janeide Muritiba de Oliveira who help coordinating the laboratory. PhD. Luciano Morais Lião, coordinator of



the Nuclear Magnetic Resonance Laboratory of the Chemistry Institute of the Federal University of Goiás.

## FUNDING SOURCE

Research was supported by grants and scholarships of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 473510/20081 Edital 14/2008 and 479884/2010-2 Edital 14/2010), the State of Bahia Research Foundation (FAPESB - 7946/2014 Edital REDE 0016/2014; SUS 0008/2009 Edital 004/2009; INFRA Edital 003/2015, INFRA PIE0020/2016) and Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES – Financial code 001), Tutorial Educational Program (PET Biotecnologia, MEC/ FNDE/SESU), and MCT/FINEP/CT-INFRA.

## REFERENCES

- Abou Neel, E.A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A.M., Bozec, L., Mudera, V., 2016. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int. J. Nanomedicine* 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simões, M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1007. <https://doi.org/10.1039/c2np20035j>
- Ajiboye, T.O., Habibu, R.S., Saidu, K., Haliru, F.Z., Ajiboye, H.O., Aliyu, N.O., Ibitoye, O.B., Uwazie, J.N., Muritala, H.F., Bello, S.A., Yusuf, I.I., Mohammed, A.O., 2017. Involvement of oxidative stress in protocatechuic acid-mediated bacterial lethality. *Microbiologyopen* 6, e00472. <https://doi.org/10.1002/mbo3.472>
- Almeida, A.A.P., Naghetini, C.C., Santos, V.R., Antonio, A.G., Farah, A., Glória, M.B.A., 2012. Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Res. Int.* 49, 459–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.026>
- Amariz, I.A.E., Pereira, E.C.V., Alencar Filho, J.M.T. de, Silva, J.P. da, Souza, N.A.C. de, de

Oliveira, A.P., Rolim, L.A., Pereira, R.N., 2020. Chemical study of *Mimosa tenuiflora* barks. *Nat. Prod. Res.* 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813135>

André, C.B., Rosalen, P.L., Galvão, L.C. de C., Fronza, B.M., Ambrosano, G.M.B., Ferracane, J.L., Giannini, M., 2017. Modulation of *Streptococcus mutans* virulence by dental adhesives containing anti-caries agents. *Dent. Mater.* 33, 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.07.006>

Baker, J.L., Faustoferri, R.C., Quivey, R.G., 2017. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans* -the more we know, the more we don't. *Mol. Oral Microbiol.* 32, 107–117. <https://doi.org/10.1111/omi.12162>

Bezerra, D.A.C., Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M. da, Pereira, A.V., Sousa, E.O. de, Rodrigues, O.G., 2011. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. *Acta Sci. Biol. Sci.* 33, 99–106. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v33i1.5366>

Byakika, S., Mukisa, I.M., Mugabi, R., Muyanja, C., 2019. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Starters against Acid Tolerant, Antibiotic Resistant, and Potentially Virulent *E. coli* Isolated from a Fermented Sorghum-Millet Beverage. *Int. J. Microbiol.* 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/2013539>

Cai, L., Wu, C.D., 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J. Nat. Prod.* 59, 987–990. <https://doi.org/10.1021/np960451q>

Castillo Pedraza, M.C., Novais, T.F., Faustoferri, R.C., Quivey, R.G., Terekhov, A., Hamaker, B.R., Klein, M.I., 2017. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling* 33, 722–740. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1361412>

Cechinel Filho, V., Schlemper, V., Santos, A.R.S., Pinheiro, T.R., Yunes, R.A., Mendes, G.L.,

- Calixto, J.B., Delle Monache, F., 1998. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *J. Ethnopharmacol.* 62, 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00069-5)
- Chen, L., Ren, Z., Zhou, X., Zeng, J., Zou, J., Li, Y., 2016. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 857–867. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7092-1>
- CHO, J.-Y., MOON, J.-H., SEONG, K.-Y., PARK, K.-H., 1998. Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid and trans 4-Hydroxycinnamic Acid Isolated and Identified from Rice Hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2273–2276. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2273>
- Cross, S.E., Kreth, J., Zhu, L., Sullivan, R., Shi, W., Qi, F., Gimzewski, J.K., 2007. Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of *Streptococcus mutans* probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology* 153, 3124–3132. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007625-0>
- 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., 2016. Antinoceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). *PLoS One* 11, e0150839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150839>
- Dragoš, A., Kovács, Á.T., 2017. The Peculiar Functions of the Bacterial Extracellular Matrix. *Trends Microbiol.* 25, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.010>
- Fabry, W., Okemo, P.O., Ansorg, R., 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 60, 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00128-1)
- Fernandes, D.C., Regasini, L.O., Velloso, J.C.R., Pauletti, P.M., Castro-gamboa, I., Bolzani, V.S., Oliveira, O.M.M., Silva, D.H.S., 2008. Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging

Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 56, 723–726.

<https://doi.org/10.1248/cpb.56.723>

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016.

Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Fozo, E.M., Quivey, R.G., 2004. The *fabM* Gene Product of *Streptococcus mutans* Is Responsible for the Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids and Is Necessary for Survival at Low pH. *J. Bacteriol.* 186, 4152–4158. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4152-4158.2004>

<https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4152-4158.2004>

Fozo, E.M., Scott-Anne, K., Koo, H., Quivey, R.G., 2007. Role of Unsaturated Fatty Acid

Biosynthesis in Virulence of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 75, 1537–1539.

<https://doi.org/10.1128/IAI.01938-06>

Gabe, V., Kacergius, T., Abu-Lafi, S., Kalesinskas, P., Masalha, M., Falah, M., Abu-Farich, B.,

Melninkaitis, A., Zeidan, M., Rayan, A., 2019. Inhibitory Effects of Ethyl Gallate on

*Streptococcus mutans* Biofilm Formation by Optical Profilometry and Gene Expression

Analysis. *Molecules* 24, 529. <https://doi.org/10.3390/molecules24030529>

Gao, X., Jiang, S., Koh, D., Hsu, C.-Y.S., 2016. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol.*

2000 70, 128–141. <https://doi.org/10.1111/prd.12100>

Goyal, D., Sharma, S., Mahmood, A., 2013. Inhibition of dextransucrase activity in *Streptococcus*

*mutans* by plant phenolics. *Indian J. Biochem. Biophys.* 50, 48–53.

Ham, Y., Kim, T.-J., 2020. Inhibitory Effect of Phenolic Acids in *Rubus coreanus* on

Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Curr. Microbiol.* 77, 3695–3703.

<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02179-w>

Hamada, S., Slade, H.D., 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*.

*Microbiol. Rev.* 44, 331–384. <https://doi.org/10.1128/MR.44.2.331-384.1980>

- Hanada, N., Kuramitsu, H.K., 1989. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* 57, 2079–2085.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.57.7.2079-2085.1989>
- Hanada, N., Kuramitsu, H.K., 1988. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect. Immun.* 56, 1999–2005.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.56.8.1999-2005.1988>
- Huang, C.B., Alimova, Y., Myers, T.M., Ebersole, J.L., 2011. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 56, 650–654.  
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>
- Jalali, O., Best, M., Wong, A., Schaeffer, B., Bauer, B., Johnson, L., 2020. Protocatechuic Acid as a Topical Antimicrobial for Surgical Skin Antisepsis. *JBJS Open Access* 5, e19.00079-e19.00079.  
<https://doi.org/10.2106/JBJS.OA.19.00079>
- Jeon, J.-G., Rosalen, P.L., Falsetta, M.L., Koo, H., 2011. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res.* 45, 243–263.  
<https://doi.org/10.1159/000327250>
- Kang, M.-S., Oh, J.-S., Kang, I.-C., Hong, S.-J., Choi, C.-H., 2008. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *J. Microbiol.* 46, 744–750. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0235-7>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., Thurnheer, T., 2020. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 28, 668–681.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Keman, D., Soyer, F., 2019. Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* Does Not Develop Resistance to Vanillic Acid and 2-Hydroxycinnamic Acid after Continuous Exposure in Vitro. *ACS Omega* 4, 15393–15400. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01336>

- Kim, M., Jeon, J., Kim, J., 2018. Streptococcus mutans extracellular DNA levels depend on the number of bacteria in a biofilm. *Sci. Rep.* 8, 13313. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31275-y>
- Kinnunen, T., Koskela, M., 1991. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. *Acta Derm. Venereol.* 71, 148–150.
- Klein, M.I., DeBaz, L., Agidi, S., Lee, H., Xie, G., Lin, A.H.M., Hamaker, B.R., Lemos, J.A., Koo, H., 2010. Dynamics of Streptococcus mutans Transcriptome in Response to Starch and Sucrose during Biofilm Development. *PLoS One* 5, e13478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013478>
- Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 740–755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>
- Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I., 2009. Extracellular Polysaccharides Matrix — An Often Forgotten Virulence Factor in Oral Biofilm Research. *Int. J. Oral Sci.* 1, 229–234. <https://doi.org/10.4248/IJOS.09086>
- Kuhnert, W.L., Zheng, G., Faustoferri, R.C., Quivey, R.G., 2004. The F-ATPase Operon Promoter of Streptococcus mutans Is Transcriptionally Regulated in Response to External pH. *J. Bacteriol.* 186, 8524–8528. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8524-8528.2004>
- Kumar, R., Chandar, B., Parani, M., 2018. Use of succinic & oxalic acid in reducing the dosage of colistin against New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 bacteria. *Indian J. Med. Res.* 147, 97. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1407\\_16](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1407_16)
- Kwak, A.-M., Lee, I.-K., Lee, S.-Y., Yun, B.-S., Kang, H.-W., 2016. Oxalic Acid from Lentinula edodes Culture Filtrate: Antimicrobial Activity on Phytopathogenic Bacteria and Qualitative and Quantitative Analyses. *Mycobiology* 44, 338–342. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.338>
- Lemos, J.A., Burne, R.A., 2008. A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans.

Microbiology 154, 3247–3255. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/023770-0>

Lemos, J.A., Palmer, S.R., Zeng, L., Wen, Z.T., Kajfasz, J.K., Freires, I.A., Abranches, J., Brady, L.J., 2019. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Spectr.* 7, 435–448. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>

Lemos, J.A., Quivey, R.G., Koo, H., Abranches, J., 2013. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology* 159, 436–445. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066134-0>

Liao, S., Klein, M.I., Heim, K.P., Fan, Y., Bitoun, J.P., Ahn, S.-J., Burne, R.A., Koo, H., Brady, L.J., Wen, Z.T., 2014. *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. *J. Bacteriol.* 196, 2355–2366. <https://doi.org/10.1128/JB.01493-14>

Lozoya, X., Navarro, V., Arnason, J.T., Kourany, E., 1989. Experimental evaluation of *mimosa tenuiflora* (willd.) poir. (Tepescohuite) I. Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. 20, 87–93.

Mah, T.-F., 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 7, 1061–1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>

Maria, R.M.-C., Carlus, A.O. dos S., Eduardo, R. de L., Maria, do S.V.P., Kenio, C. de L., 2018. Antibacterial and anti-adherent effect of *Mimosa tenuiflora* and *Myrciaria cauliflora* on dental biofilm bacteria. *African J. Microbiol. Res.* 12, 181–185. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8796>

Nagasawa, R., Yamamoto, T., Utada, A.S., Nomura, N., Obana, N., 2020. Competence-Stimulating-Peptide-Dependent Localized Cell Death and Extracellular DNA Production in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e02080-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02080-20>

- Nalawade, T., Sogi, S.P., Bhat, K., 2015. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 5, 114. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.155736>
- Padilha, I.Q.M., Pereira, A. V., Rodrigues, O.G., Siqueira-Júnior, J.P., Pereira, M. do S. V., 2010. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 45–47. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100010>
- Passos, M.R., Almeida, R.S., Lima, B.O., Rodrigues, J.Z. de S., Macêdo Neres, N.S. de, Pita, L.S., Marinho, P.D.F., Santos, I.A., da Silva, J.P., Oliveira, M.C., Oliveira, M.A., Pessoa, S.M.B., Silva, M.M.L., Silveira, P.H.S., Reis, M.M., Santos, I.P., Ricardo, L. de O.N., Andrade, L.O.S.B., Soares, A.B., Correia, T.M.L., Souza, É.P. de, Pires, P.N., Cruz, M.P., Marques, L.M., Uetanabaro, A.P.T., Yatsuda, R., 2021. Anticariogenic activities of *Libidibia ferrea*, gallic acid and ethyl gallate against *Streptococcus mutans* in biofilm model. *J. Ethnopharmacol.* 274, 114059. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114059>
- Pegoraro, J., Silvestri, L., Stefenon, L., Cara, G., Mozzini, C.B., 2014. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. *J Oral Invest* 3, 33–37. <https://doi.org/10.18256/2238-510X/j.oralinvestigations.v3n1p33-37>
- Phan, T.-N., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, J.D., Marquis, R.E., 2004. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* 19, 31–38. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00109.x>
- Pitts, N., Zero, D., 2016. White Paper on Dental Caries Prevention and Management. *Caries Prev. Partnersh.* 1–59.
- Pitts, N.B., Zero, D.T., Marsh, P.D., Ekstrand, K., Weintraub, J.A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., Ismail, A., 2017. Dental caries. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17030.



<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>

Qian, W., Yang, M., Wang, T., Sun, Z., Liu, M., Zhang, J., Zeng, Q., Cai, C., Li, Y., 2020.

Antibacterial Mechanism of Vanillic Acid on Physiological, Morphological, and Biofilm

Properties of Carbapenem-Resistant *Enterobacter hormaechei*. *J. Food Prot.* 83, 576–583.

<https://doi.org/10.4315/JFP-19-469>

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M., 2015. The Formation of Biofilms by

*Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with

Control Mechanisms. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>

Rego, E.A., 2012. Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. *Univ. Dos*

Açores Dep. Ciências Tecnológicas E Desenvolv. 101.

Ríos, J.L., Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100,

80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

Rodrigues, J.Z. de S., Passos, M.R., Silva de Macêdo Neres, N., Almeida, R.S., Pita, L.S., Santos, I.A.,

Santana Silveira, P.H., Reis, M.M., Santos, I.P., de Oliveira Negrão Ricardo, L., Lima, B.O.,

D'Orleans Farias Marinho, P., Soares, A.B., Silva Bastos Andrade, L.O., Brasileiro Pessoa, S.M.,

Leles Silva, M.M., Oliveira, M.C., Pinheiro da Silva, J., Moura, M.A., Cruz, M.P., Marques,

L.M., Santos, T.T., Pires, P.N., Teixeira Dias, J.C., Rezende, R.P., Trovatti Uetanabaro, A.P.,

Yatsuda, R., 2020. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against

*Streptococcus mutans* UA159. *Microb. Pathog.* 142, 104063.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104063>

Sendamangalam, V., Choi, O.K., Kim, D., Seo, Y., 2011. The anti-biofouling effect of polyphenols

against *Streptococcus mutans*. *Biofouling* 27, 13–19.

<https://doi.org/10.1080/08927014.2010.535897>

Senpuku, H., Nakamura, T., Iwabuchi, Y., Hirayama, S., Nakao, R., Ohnishi, M., 2019. Effects of

Complex DNA and MVs with GTF Extracted from *Streptococcus mutans* on the Oral Biofilm.

*Molecules* 24, 3131. <https://doi.org/10.3390/molecules24173131>

Shao, D., Li, Jing, Li, Ji, Tang, R., Liu, L., Shi, J., Huang, Q., Yang, H., 2015. Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *J. Food Sci.* 80, M1299–M1305. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12902>

Shimizu, J.F., Lima, C.S., Pereira, C.M., Bittar, C., Batista, M.N., Nazaré, A.C., Polaquini, C.R., Zothner, C., Harris, M., Rahal, P., Regasini, L.O., Jardim, A.C.G., 2017. Flavonoids from *Pterogyne nitens* Inhibit Hepatitis C Virus Entry. *Sci. Rep.* 7, 16127. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16336-y>

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P. de, Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2007. FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO, 6<sup>a</sup> ed. ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre-RS.

Simões, M., Bennett, R.N., Rosa, E.A.S., 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat. Prod. Rep.* 26, 746. <https://doi.org/10.1039/b821648g>

Singh, P., Singh, V.K., Singh, A.K., 2019. Molecular docking analysis of candidate compounds derived from medicinal plants with type 2 diabetes mellitus targets. *Bioinformation* 15, 179–188. <https://doi.org/10.6026/97320630015179>

Vandal, J., Abou-Zaid, M.M., Ferroni, G., Leduc, L.G., 2015. Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada. *Pharm. Biol.* 53, 800–806. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.942867>

Vargas-Segura, A.I., Silva-Belmares, S.Y., Segura-Ceniceros, E.P., Ascacio-Valdés, J.A., Méndez-González, L., Ilyina, A., 2020. Screening and characterization of medicinal plants extracts with bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. *Nat. Prod. Res.* 34, 2672–2676.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550757>

Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

<https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>

Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., Song, Z.-J., 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>

Xiao, J., Koo, H., 2010. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 108, 2103–2113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04616.x>

Yanagida, A., Kanda, T., Tanabe, M., Matsudaira, F., Oliveira Cordeiro, J.G., 2000. Inhibitory Effects of Apple Polyphenols and Related Compounds on Cariogenic Factors of Mutans Streptococci. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5666–5671. <https://doi.org/10.1021/jf000363i>

Zhanzhaxina, A.S., Seiilgazy, M., Jalmakhanbetova, R.I., Ishmuratova, M.Y., Seilkhanov, T.M., Oyama, M., Sarmurzina, Z.S., Tekebayeva, Z.B., Suleimen, Y.M., 2020. Flavonoids from *Pulicaria vulgaris* and Their Antimicrobial Activity. *Chem. Nat. Compd.* 56, 915–917. <https://doi.org/10.1007/s10600-020-03185-x>

**Table 1** Antibacterial activity and yield of ethanolic extract, fractions, subfractions and Sorbifolin from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves against *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

<i>Mimosa tenuiflora</i> leaves	Extract Yield (%)	Antibacterial activity against <i>S. mutans</i> ATCC 700610 ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		MIC	MBC	MICA
Ethanol extract (EEMT)	15.97	31.25	62.5	15.75
Hexane fraction ( HFMT )	21.58	#	#	#
Dichloromethane fraction (DFMT)	59.32	15.62	31.25	7.875
Fraction of ethyl acetate (EAFMT)	5.42	62.5	250	62.5
Subfraction D1	0.45	500	#	#
Subfraction D2	1.63	125	#	#
Subfraction D3	2.79	125	#	#
Subfraction D4	7.50	125	#	#
Subfraction D5	16.98	31.25	62.5	#
Subfraction D6	62.42	31.25	250	#
Subfraction D5.1	0.03	#	#	NT
Subfraction D5.2	0.22	1000	1000	NT
Subfraction D5.3	0.30	#	#	NT
Subfraction D5.4	1.79	#	#	NT
Subfraction D5.5	2.28	500	#	NT
Subfraction D5.6	1.71	1000	#	NT
Subfraction D5.7	6.19	250	#	NT
Subfraction D5.8	28.95	125	250	NT
Subfraction D5.9	6.00	62.5	125	NT
Subfraction D5.10	3.75	62.5	125	NT
Subfraction D5.11	7.35	62.5	250	NT
Subfraction D5.12	1.78	250	#	NT
Subfraction D5.13	10.05	#	#	NT
Subfraction D5.14	16.21	15.62	62.5	NT
Subfraction D5.15	0.56	#	#	NT
Subfraction D6.1	0.10	#	#	NT

Subfraction D6.2	0.08	1000	1000	NT
Subfraction D6.3	0.10	1000	#	NT
Subfraction D6.4	0.35	125	500	NT
Subfraction D6.5	0.91	62.5	125	NT
Subfraction D6.6	1.60	62.5	125	NT
Subfraction D6.7	8.99	31.25	62.5	NT
Subfraction D6.8	49.92	31.25	62.5	NT
Subfraction D6.9	20.07	62.5	125	NT
Subfraction D5.8.1	4.37	500	#	#
Sorbifolin (D6.6.1)	17.31	125	#	#

Notes: The values of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Inhibitory Concentration of Cell Adhesion (MICA) are expressed in  $\mu\text{g/mL}$ . Concentrations ranged from 7.875 to 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 9$ ). # Did not show antimicrobial and/or non-adherence activity at the highest concentrations tested (1000  $\mu\text{g/mL}$ ). NT - Not tested. The yield is expressed as a percentage of the mass used in the production of the extracts.

**Table 2** Relative percentage of the chemical constituents identified in the Dichloromethane fraction and its subfractions from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret leaves obtained by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry.

Rt	Identification	DFMT	D5	D6	D5.8	D5.9	D5.10	D5.11	D5.14	D6.4	D6.6	D6.7	D6.8	D6.9	D5.8.1	D6.6.1
4.61	Ethylene glycol	-	-	-	-	-	-	-	0.38	-	-	-	-	0.06	-	-
5.03	Propylene glycol	-	-	-	-	-	-	-	0.24	-	-	-	-	0.06	-	-
6.91	Lactic acid	3.24	0.31	0.65	0.78	2.23	0.12	-	0.06	0.12	-	0.02	0.01	2.08	-	-
7.22	Caproic acid	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-	0.07	-	-	-	-
9.54	Oxalic acid	-	-	-	-	-	-	-	0.20	-	-	-	-	0.17	-	-
9.85	3-hydroxypropanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-
10.07	Pinacol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24	-	-	-	-
10.40	(R)-3-Hydroxybutyric acid	1.67	-	1.17	-	4.32	-	-	0,10	-	-	-	-	4.23	-	-
11.09	3-acetyloxybutanoic acid	0.18	-	-	-	0.76	-	-	1.24	-	-	-	-	0.62	-	-
15.47	Phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-
15.66	3-hydroxycaproic acid	0.21	-	0.41	-	1.82	-	-	-	-	-	-	-	1.65	-	-
17.39	Pipecolic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-
18.65	hydroquinone	-	0.17	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-
19.52	Pentitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-
21.49	Methyl p-anisate	-	-	-	-	-	-	-	-	9.38	-	-	-	-	-	-
22.09	Salicylic acid	0.23	-	-	-	0.81	-	-	0.15	-	-	-	-	0.62	-	-
22.31	4-methoxybenzoate	-	-	-	-	-	-	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-
23.60	Threonic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-
25.51	4-hydroxybenzoic acid	0.22	1.46	-	-	-	-	-	2.52	0.15	-	-	-	-	-	-

<b>Rt</b>	<b>Identification</b>	<b>DFMT</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>	<b>D5.8</b>	<b>D5.9</b>	<b>D5.10</b>	<b>D5.11</b>	<b>D5.14</b>	<b>D6.4</b>	<b>D6.6</b>	<b>D6.7</b>	<b>D6.8</b>	<b>D6.9</b>	<b>D5.8.1</b>	<b>D6.6.1</b>
26.07	Lauric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	-	-	-
29.31	Vanillic acid	-	-	-	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-
30.82	Protocatechuic acid	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-	-	-	-	-
32.00	N,N-Dimethyltryptamine	0.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33.18	Methyl palmitate	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18	-	-	-	-	-	-
33.92	Ethyl gallate	14.25	8.36	6.43	-	-	2.24	40.39	0.07	-	-	-	0.82	-	-	-
34.43	Gallic acid	3.55	-	2.38	-	0.24	-	-	-	-	-	-	1.11	0.16	-	-
36.02	Palmitic acid	1.42	0.28	-	-	0.49	-	-	-	0.17	-	-	-	0.20	-	-
37.34	Methyl linolenate	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-
37.91	Methyl stearate	-	-	-	-	-	-	-	-	0.14	-	-	-	-	-	-
38.96	Phytol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-	-	-
46.86	2-Palmitoylglycerol	-	-	-	-	-	0.53	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
47.32	Glyceryl palmitate	-	0.39	-	-	-	0.93	0.31	-	-	-	0.49	-	-	-	-
47.49	1-Monolinolein	-	-	-	-	-	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50.35	2-Stearoylglycerol	-	-	-	-	-	1.16	-	-	-	-	0.09	-	-	-	-
50.92	Glyceryl monostearate	0.14	0.71	-	-	-	11.18	0.17	-	-	-	0.86	-	-	-	-
52.55	Nonadecanoil glycerol	-	-	-	-	-	0.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52.65	4.5.7-Trihydroxyflavanone	0.30	0.21	-	-	-	-	-	-	1.79	-	-	-	-	-	-
53.57	2-Palmitoylglycerol	-	-	-	-	-	0.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58.48	Sorbifolin	4.66	-	-	17.05	-	-	-	-	-	31.31	3.8	-	-	73.37	100

<b>Rt</b>	<b>Identification</b>	<b>DFMT</b>	<b>D5</b>	<b>D6</b>	<b>D5.8</b>	<b>D5.9</b>	<b>D5.10</b>	<b>D5.11</b>	<b>D5.14</b>	<b>D6.4</b>	<b>D6.6</b>	<b>D6.7</b>	<b>D6.8</b>	<b>D6.9</b>	<b>D5.8.1</b>	<b>D6.6.1</b>
<b>% Identified compounds</b>		<b>30.47</b>	<b>11.89</b>	<b>11.04</b>	<b>17.83</b>	<b>10.68</b>	<b>23.18</b>	<b>41.39</b>	<b>5.65</b>	<b>12.48</b>	<b>31.31</b>	<b>5.57</b>	<b>1.94</b>	<b>10.18</b>	<b>73.37</b>	<b>100.0</b>
<b>% Identified sugar</b>		0.13	0.00	0.97	0.00	1.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00	0.00
<b>% Unidentified compounds</b>		69.4	88.11	87.99	99.22	87.7	76.82	58.61	94.35	87.52	68.69	94.43	97.61	89.82	26.63	0.00

Rt: Retention time in minutes.

DFMT: Dichloromethane fraction.

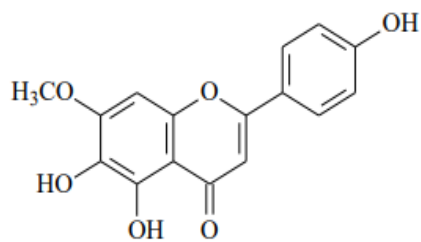


Treatments	CFU/ biofilm	Dry weight Biofilm (mg)	Soluble glucans in alkali mg/biofilm	Soluble glucans $\mu$ g/biofilm	Insoluble glucans mg/biofilm	eDna ng/uL
Vehicle	$4.28 \times 10^9 \pm 8.77 \times 10^{8a}$	$20.13 \pm 5.72^a$	$1.400 \pm 0.74^a$	$0.2500 \pm 0.07^a$	$0.9675 \pm 0.29^a$	$1084 \pm 157.8^a$
Chlorhexidine 0.12%	$2.71 \times 10^6 \pm 7.02 \times 10^{5b}$	$8.75 \pm 1.19^b$	$0.867 \pm 0.41^a$	$0.0950 \pm 0.02^b$	$0.2700 \pm 0.05^b$	$865.1 \pm 68.37^{ab}$
DFMT 3.125 mg/mL	$9.42 \times 10^9 \pm 1.70 \times 10^{10a}$	$29.31 \pm 6.87^a$	$1.331 \pm 0.84^a$	$0.1400 \pm 0.05^b$	$0.3571 \pm 0.10^b$	$674.1 \pm 189.9^b$
DFMT 6.25 mg/mL	$6.63 \times 10^6 \pm 1.37 \times 10^{6b}$	$30.63 \pm 12.33^a$	$1.449 \pm 0.72^a$	$0.2288 \pm 0.06^a$	$0.4200 \pm 0.17^b$	$698.1 \pm 135.8^b$

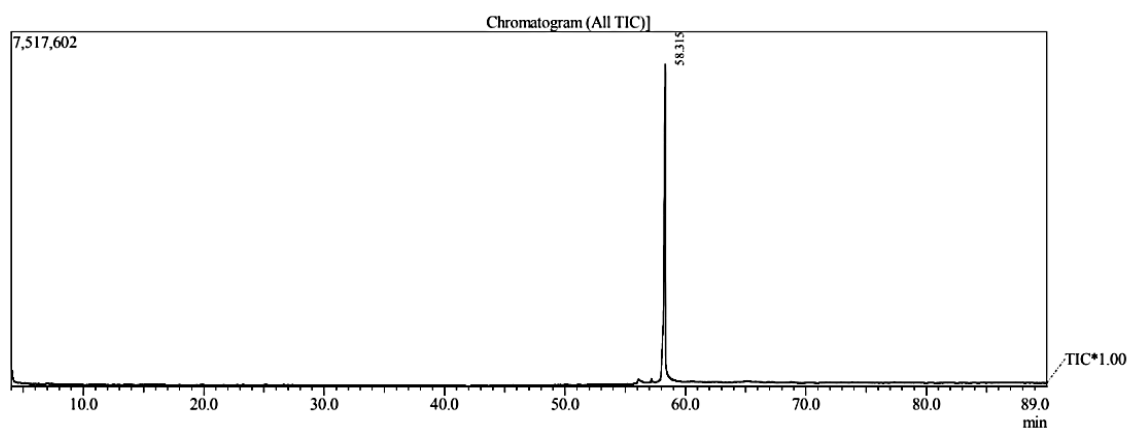
**Table 3** Effect of the Dichloromethane fraction of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret on the biofilm of *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

The values in the same column followed by the same letters are statistically equal ( $p > 0.05$ ). Statistical comparisons were performed between DFMT 100 x MBC (3.125 mg/mL), DFMT 200 x MBC (6.250 mg/mL), the vehicle (10% ethanol, v/v) and chlorhexidine 0.12%. The variables were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons post-test ( $n = 9$ ). DFMT: Dichloromethane fraction.

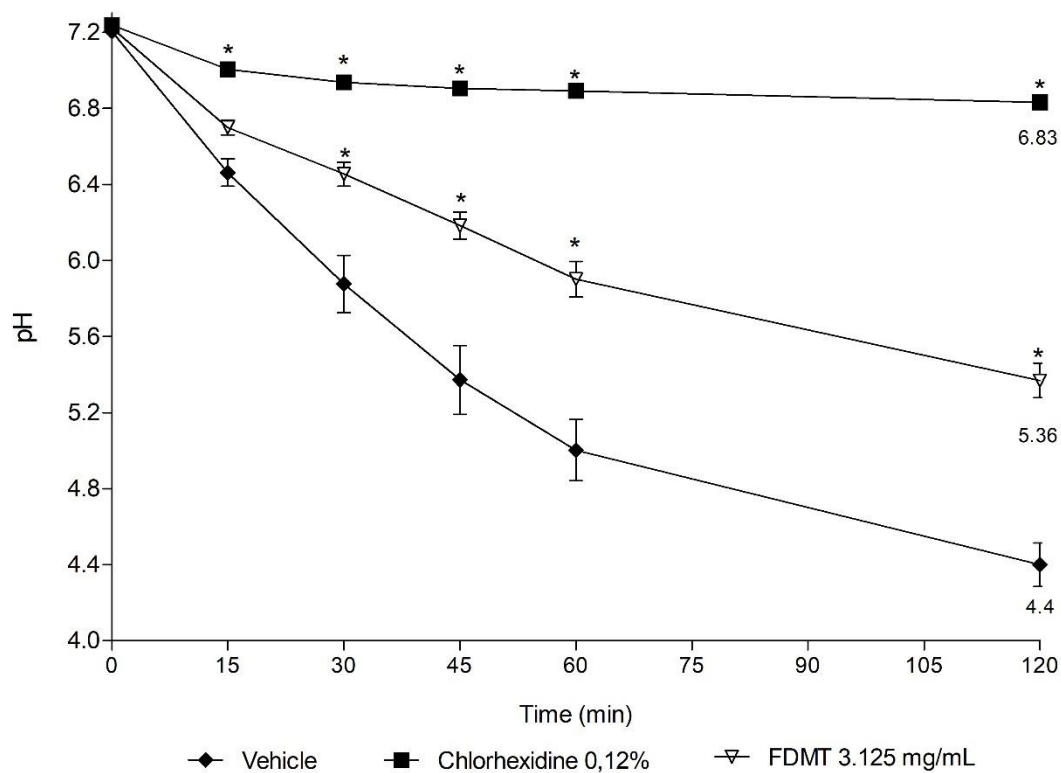
**Fig. 1** Chemical structure of 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (Sorbifolin).



**Fig. 2** Total ion chromatogram (TIC) of the D6.6.1 subfraction, evidence of the isolation of the flavonoid identified as 5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (Sorbifolin).

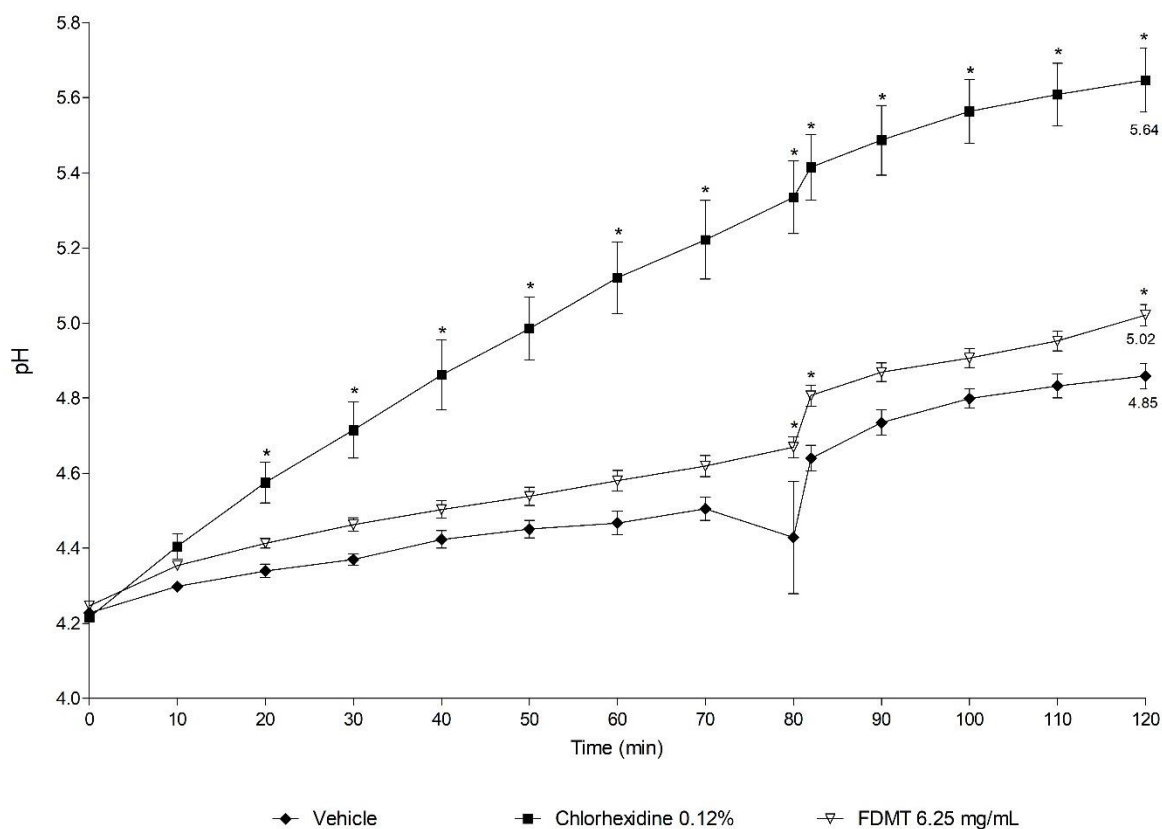


**Fig. 3** Effects of dichloromethane fraction of *Mimosa tenuiflora* leaves on the glycolytic pathway of *Streptococcus mutans*.

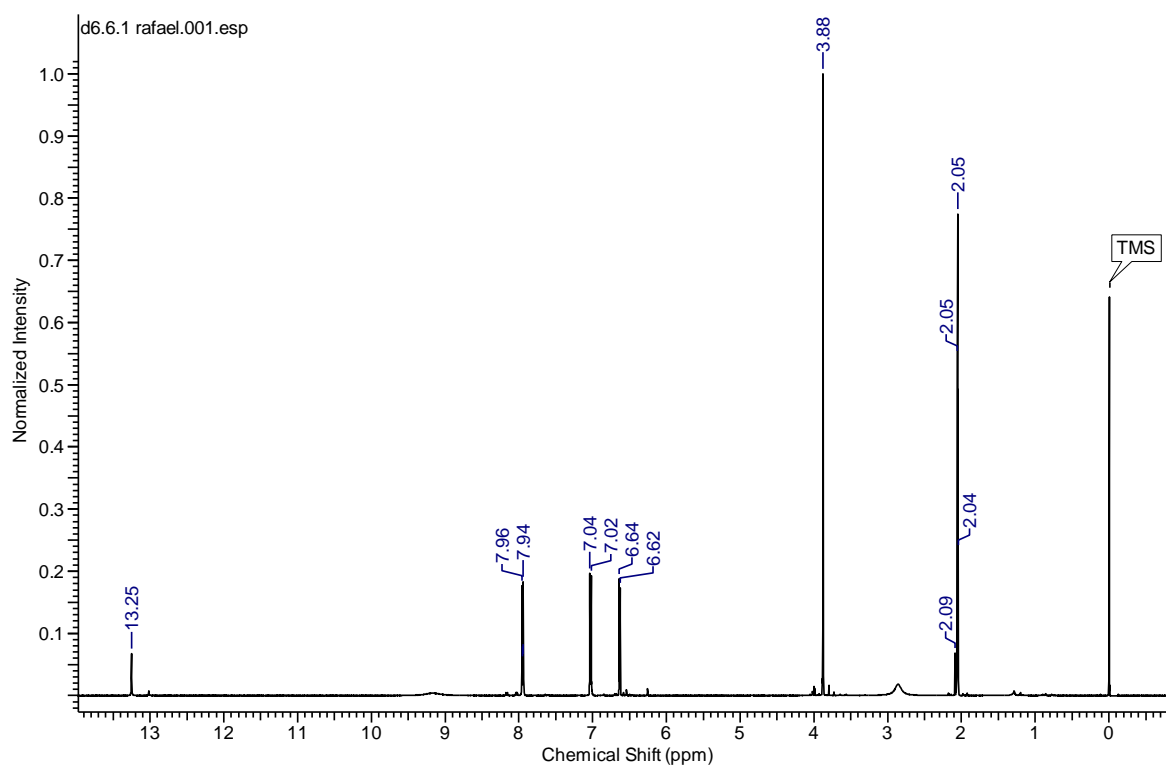


A statistical difference was found between DFMT (3.125 mg/mL) and chlorhexidine 0.12% compared to treatment with the vehicle ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed by Two-way ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni test ( $n = 9$ ). *Streptococcus mutans* ATCC700610 biofilms.

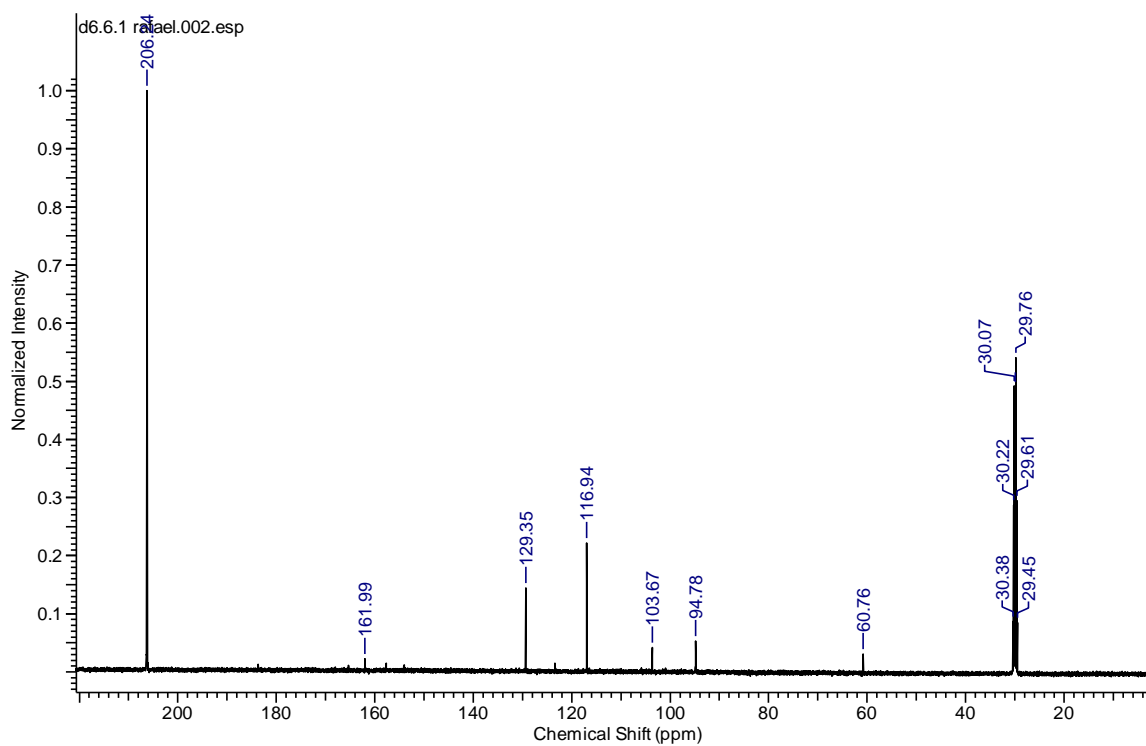
**Fig. 4** Effect of dichloromethane fraction of *Mimosa tenuiflora* leaves on proton permeability test with *Streptococcus mutans*.



A statistical difference was found between DFMT (6.25 mg/mL) and chlorhexidine 0.12% compared to treatment with the vehicle ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed by Two-way ANOVA, comparing all pairs with the Bonferroni test ( $n = 9$ ). *Streptococcus mutans* ATCC700610 biofilms.

**Supporting Information 1.** Sorbifolin  $^1\text{H}$  RMN spectral data.

Sorbifolin  $^1\text{H}$  RMN spectral data [500 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ ,  $\delta$  (ppm)].

**Supporting Information 2.** Sorbifolin  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data.

Sorbifolin  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data [125 MHz,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ ,  $\delta$  (ppm)].

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas medicinais são uma importante fonte de estudos na descoberta de novos fitoterápicos ou fitofármacos como método alternativo e complementar no controle da formação de biofilme cariogênico, evitando a formação de cáries. Assim, *M. tenuiflora* é uma planta promissora para indicação terapêutica na clínica odontológica, visto que seu extrato etanólico, frações e subfrações apresentam atividade bacteriostática e bactericida contra *S. mutans* planctônicos. Além disso, possui em sua composição diversos compostos antimicrobianos, como a sorbifolina, da qual demonstramos pela primeira vez na literatura sua presença nas folhas das plantas e sua atividade bacteriostática contra o *S. mutans* planctônico. Destaca-se neste estudo a fração de diclorometano, que não só reduziu a viabilidade celular de *S. mutans* em um biofilme, mas também reduziu os níveis de eDNA, polissacarídeos solúveis e insolúveis que estão diretamente envolvidos na formação da matriz extracelular, que proporciona aderência bacteriana, agregação, acúmulo e aumento da biomassa do biofilme que levam à resistência antimicrobiana e de defesa do hospedeiro. Além disso, a fração diclorometano reduziu a acidogenicidade e aciduricidade de *S. mutans* que promovem a desmineralização do esmalte pela produção de ácidos e favorecem o predomínio de bactérias tolerantes a ácidos no ambiente. Assim, a fração do diclorometano, por fragilizar o biofilme cariogênico, pode reduzir a desmineralização do esmalte, fatores predisponentes para o desenvolvimento de cárie dentária, sendo necessária a confirmação dessas atividades farmacológicas em futuros estudos *in vivo*.



## **ANEXO 1**

Reveladores para CCD

### **Ferrocianeto de potássio 1% (m/v)**

A solução foi preparada pela dissolução de 0,10 g de ferrocianeto de potássio em 10 mL de água destilada e foi armazenada a -4°C.

### **Cloreto de Ferro III 2% (m/v)**

O reagente foi preparado pela adição de 0,20 g de cloreto de ferro a 10 mL de água destilada e guardou-se a -4°C.

### **Reagente de Liebermann-Burchard**

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol, enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio, devido à sua instabilidade.

### **Reagente de Wagner**

O reagente foi preparado pela dissolução de 1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 50 mL de água destilada e pela adição de 2 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 100 mL com água destilada.

### **Cloreto de alumínio 1% em etnaol (m/v).**

A solução foi preparada pela solubilização de 1g de cloreto em 100 mL de etanol e foi armazenada a -4°C.

### **Solução etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5%**

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol em balão volumétrico e o volume foi completado até 100 mL.

### **Solução metanólica de Cloreto de Ferro III 2%**

O reagente foi preparado pela adição de 0,20 g de cloreto de ferro a 10 mL metanol e guardou-se a  $-4^{\circ}\text{C}$ .