

**Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans***

**Ana Carolina dos Santos Ré**

**Ribeirão Preto**  
**2022**

**ANA CAROLINA DOS SANTOS RÉ**

**Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carolina Patrícia Aires

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 13/05/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto  
2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ré, Ana Carolina dos Santos

Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans*. Ribeirão Preto, 2022.

48 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Aires, Carolina Patrícia.

1. Polissacarídeos. 2. Biofilme de *S. mutans*. 3. Parede bacteriana.

## RESUMO

RÉ, A.C.S. **Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de *Streptococcus mutans***. 2022. 48f. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

*Streptococcus mutans* é um dos microrganismos relacionados ao desenvolvimento da cárie dental, produzindo o biofilme, uma estrutura tridimensional complexa composta principalmente por polissacarídeos, que podem ser classificados como: *i*) polissacarídeos extracelulares, dispersos por toda a matriz, protegendo bactérias especialmente de compostos antimicrobianos; *ii*) polissacarídeos de parede celular contendo raminose (PRAM) ancorados ao peptidoglicano, essenciais para a virulência bacteriana e *iii*) polissacarídeos intracelulares (PIC), polímeros estocados no interior da célula, atuando como reserva energética. Em contraste com os polissacarídeos extracelulares, a determinação da estrutura química e o estabelecimento de um protocolo para a extração do PRAM e do PIC ainda é um desafio e não está estabelecida na literatura. Assim, considerando a importância biológica dos PRAM e dos PIC, o objetivo deste trabalho foi avaliar um protocolo de extração destes polímeros e suas características estruturais a partir de biofilme de *S. mutans*. Biofilmes de *S. mutans* UA159 foram formados em lâminas de vidro por 5 dias, sendo coletados e processados para a retirada da matriz microbiana, composta por polímeros extracelulares. As células bacterianas resultantes foram submetidas a parâmetro químico (extração alcalina a quente com NaOH 0,5M ou 1M por 5, 10 ou 15 minutos a 100 °C) ou físico (sonicação com 1 pulso de 15 s com potência de 5W ou 20W em água ou solução salina) para obtenção dos polissacarídeos de parede celular e dos polissacarídeos intracelulares. Após hidrólise ácida (ácido trifluoracético por 8 horas a 100 °C), a composição monossacarídica de todos os grupos experimentais foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de índice de refração, sendo o protocolo de extração com NaOH 1M a 100 °C por 15 minutos selecionado para a caracterização química das estruturas, utilizando-se ressonância magnética nuclear (RMN). Os resultados sugerem que enquanto o PIC é um polissacarídeo de glucanas com cadeia principal  $\alpha$ -(1→4) ligado com cadeias laterais ramificadas  $\alpha$ -(1→6), o PRAM é uma ramnoglucana com cadeia principal  $\alpha$ -(1→2) e  $\alpha$ -(1→3) de raminose e cadeias laterais de glucose ligadas por  $\alpha$ -(1→2), sendo ambas as estruturas estudadas pela primeira vez em uma única fração. Assim, a partir de um único homogenato alcalino obtido de biofilme cariogênico foi possível esclarecer a estrutura química por RMN de duas moléculas: *i*) o polissacarídeo de parede celular, que pode ser a chave para o desenho de futuros alvos terapêuticos para antimicrobianos no futuro e *ii*) o polissacarídeo intracelular, que pode contribuir para um maior entendimento da rota metabólica de carboidratos em *S. mutans*.

Palavras-chave: glucanas, raminose, ressonância magnética nuclear, estrutura química; ramnoglucana.

## ABSTRACT

RÉ, A.C.S. **Extraction protocols and chemical characterization of cell wall polysaccharide and intracellular polysaccharide from *Streptococcus mutans* biofilm.** 2022, 48f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

*Streptococcus mutans* is one of the microorganisms related to the development of dental caries, producing a biofilm, a complex three-dimensional structure composed mainly of polysaccharides, which can be classified as: *i*) extracellular polysaccharides, dispersed throughout the biofilm matrix, protecting bacteria especially from antimicrobial compounds; *ii*) rhamnose-containing cell wall polysaccharides (RHAP) anchored to peptidoglycan, essential for bacterial virulence and *iii*) intracellular polysaccharides (IPS), polymers stored inside the cell, acting as an energy reserve. In contrast to extracellular polysaccharides, the chemical structure and the protocol for the extraction of RHAP and IPS is not established in the literature. Thus, considering the biological importance of RHAP and IPS, we aimed to evaluate a protocol for extraction of these polymers and study their structural characteristics in *S. mutans* biofilm. For this, *S. mutans* UA159 biofilms were formed on glass slides for 5 days, and were collected and processed to remove the extracellular microbial matrix. The resulting bacterial cells were submitted to chemical (hot alkaline extraction with 0.5 M or 1 M NaOH for 5, 10 or 15 min at 100 °C) or physical (sonication with 1 pulse of 15 s with potency of 5W or 20W in water or saline solution) parameters to obtain the RHAP and IPS. After acid hydrolysis (trifluoroacetic acid for 8 h at 100 °C), the monosaccharide composition of all experimental groups was determined by high performance liquid chromatography associated with a refractive index detector, and the extraction protocol with 1M NaOH, 15 min at 100 °C was selected for the chemical characterization of the structures using nuclear magnetic resonance (NMR). The results suggest that while IPS is a glucose polysaccharide with  $\alpha$ -(1→4) main chain linked with  $\alpha$ -(1→6) branched glucose side chains, RHAP is a rhamnoglucan with  $\alpha$ -(1→2) and  $\alpha$ -(1→3) rhamnose main chain and  $\alpha$ -(1→2) glucose side chains. Both structures are being studied for the first time in a single fraction. Thus, a single alkaline homogenate obtained from cariogenic biofilm helped to clarify the chemical structure by NMR of two molecules: *i*) the cell wall polysaccharide, which may be key to the design of future therapeutic targets for antimicrobials and *ii*) the intracellular polysaccharide, which may contribute to a better understanding of the carbohydrate metabolic pathway in *S. mutans*.

Keywords: glucans, rhamnose, nuclear magnetic resonance, chemical structure, rhamnoglucans.

## 1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma das doenças bucais mais comuns no mundo todo, sendo responsável por afetar pessoas de todas as faixas etárias (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Além de comprometer seriamente a qualidade de vida dos indivíduos pela presença de dor e perda dentária, a cárie também é considerada um dos fatores de risco para diversas doenças, como doenças cardíacas e doença periodontal (KIM et al., 2019; VALM, 2019). Avanços significativos tem sido realizado nos últimos anos com relação a etiologia da cárie dental, sendo o frequente consumo de carboidratos fermentáveis e a pobre higiene bucal apontados como os principais fatores relacionados a sua manifestação, o que a define como uma doença biofilme-açúcar dependente (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010; COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017; FEJERSKOV, 2004).

O biofilme dental é composto por várias espécies de microrganismos que normalmente coexistem em homeostase com o hospedeiro (PITTS et al., 2017; VALM, 2019). No entanto, a composição deste biofilme pode ser influenciada pela oferta de açúcares como a sacarose, considerado o mais cariogênico dos carboidratos (BOWEN et al., 2018; CURY et al., 2000). Uma vez exposta aos microrganismos, a sacarose é hidrolisada e pode ser metabolizada a ácidos que causam a desmineralização da estrutura dental. Além disso, a energia de hidrólise das ligações glicosídicas deste carboidrato é responsável pela síntese de polissacarídeos extracelulares (PAES LEME et al., 2006). Biofilmes formados na presença de sacarose apresentam maior quantidade de polissacarídeos extracelulares quando comparado aos biofilmes formados na presença de lactose (AIRES et al., 2002), amido (SOUZA et al., 2018), ou seus monômeros constituintes, glucose e frutose (COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017; CURY et al., 2000; TENUTA et al., 2006).

Os polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECI) produzidos por *Streptococcus mutans* são os maiores constituintes da matriz do biofilme dental cariogênico e apresentam relação bem estabelecida com a cárie dental (MATTOS-GRANER et al., 2000; NOBRE DOS SANTOS et al., 2002). Os PECI podem formar uma camada densa, espessa e porosa (DIBDIN; SHELLIS, 1988) sobre a superfície dental, o que favorece a presença de microambientes capazes de prolongar a exposição do dente aos ácidos produzidos pelas bactérias (KLEIN et al., 2015). Além dos PECI, o polissacarídeo extracelular solúvel (PECS), também disperso por toda a matriz do biofilme (COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017), é reconhecido

por seu papel na adesão primária das bactérias à superfície dental, sendo considerado um polímero importante no desenvolvimento inicial do biofilme (COSTA OLIVEIRA et al., 2020). Diferente do PECS, o polissacarídeo solúvel pode ser degradado e metabolizado pelos microrganismos orais (LEMOS et al., 2019), sendo utilizado como fonte extracelular de nutrientes, uma clara vantagem para a sobrevivência bacteriana.

Muito do conhecimento sobre a função destes carboidratos extracelulares está veiculada a definição de sua estrutura química, já estudada em biofilmes. Enquanto o PECS é uma  $\alpha$ -glucana ramificada contendo ligações (1 $\rightarrow$ 6) e (1 $\rightarrow$ 3), o PECS é uma  $\alpha$ -glucana ramificada com ligações semelhantes, mas com uma cadeia principal ligada a (1 $\rightarrow$ 3) parcialmente substituída em O-6 por cadeias laterais de glucose (AIRES et al., 2011). Entretanto, há outros polímeros bacterianos de biofilmes que ainda não foram totalmente explorados em relação à sua estrutura química, como aqueles que remanescem após a extração dos polissacarídeos extracelulares: *i*) os polímeros de parede celular, como os polissacarídeos que contêm raminose (PRAM) que são estruturas ancoradas ao peptidoglicano, essenciais na biogênese, patogênese e virulência bacteriana (MISTOU; SUTCLIFFE; VAN SORGE, 2016); e *ii*) os polímeros armazenados dentro da célula como polissacarídeos intracelulares (PICs), que podem ser usados como fonte de carboidratos para fermentação após esgotamento de nutrientes no meio extracelular (SPATAFORA et al., 1995).

A natureza imunoquímica do PRAM foi estabelecida com base em critérios sorológicos ou genéticos, apresentando uma estrutura principal de unidades de raminose ligadas a  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) com cadeias laterais de glucose (NAKANO; OOSHIMA, 2009; SHIBATA et al., 2002). Este polissacarídeo demonstrou mediar a tolerância ao estresse ambiental, suscetibilidade a antibióticos, evasão imune do hospedeiro e virulência bacteriana (KOVACS et al., 2019). Além disso, a função biológica dos PRAMs está recebendo cada vez mais atenção, uma vez que os carboidratos da parede celular frequentemente servem como um receptor de fago (SHIBATA; YAMASHITA; VAN DER PLOEG, 2009). No entanto, faltam informações sobre sua estrutura química detalhada.

Em relação ao PIC, é relatado na literatura que *S. mutans* acumula polissacarídeo intracelular iodofílico do tipo glicogênio (BUSUIOC et al., 2009; ROGER et al., 2011; SEKAR et al., 2020). Por ser considerado um polímero de reserva energética, o PIC tem sido considerado responsável por manter a degradação de carboidratos durante os períodos de jejum do hospedeiro (entre refeições), sendo por

este motivo considerado um importante fator de virulência bacteriana (COSTA OLIVEIRA et al., 2020, 2021). No entanto, embora o caráter iodofílico dos grânulos dos polissacarídeos intracelulares tenham sido assumidos como glicogênio, originando o termo “polissacarídeo tipo glicogênio” (DIPERSIO et al., 1974), a estrutura química detalhada desta estrutura ainda não foi elucidada.

Embora as estruturas de PRAM ou PIC tenham sido deduzidas usando estudos genéticos, imunoquímicos ou citoquímicos, a estrutura química fina desses polissacarídeos permanece pouco estudada. Nesse contexto, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma importante ferramenta para a elucidação de moléculas biológicas, pois o detalhamento estrutural poderá auxiliar, a longo prazo, uma melhor compreensão da capacidade patogênica bacteriana. Além disso, o estudo de PRAM ou PIC utilizando-se técnicas de RMN permanece inédito na literatura. Assim, considerando a elucidação química como um aporte para um aprofundamento futuro da compreensão funcional dos polissacarídeos, o objetivo do trabalho foi investigar as características estruturais de PRAM e PIC extraídos de biofilmes de *S. mutans*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Biofilmes de *S. mutans* UA159 foram formados em lâminas de vidro por 5 dias, sendo coletados e processados para a retirada da matriz microbiana, composta por polímeros extracelulares. As células bacterianas resultantes foram submetidas a extração química (extração alcalina a quente com NaOH 0,5 M ou 1 M por 5, 10 ou 15 minutos a 100 °C) ou física (sonicação com 1 pulso de 15 s com potência de 5W ou 20W em água ou solução salina) para obtenção dos polissacarídeos de parede celular e dos polissacarídeos intracelulares. Após hidrólise ácida (TFA 2M por 8 horas a 100 °C), a composição monossacarídica de todos os grupos experimentais foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de índice de refração, sendo o protocolo de extração com NaOH 1M, 15 min a 100 °C selecionado para a caracterização química das estruturas, utilizando-se ressonância magnética nuclear.



da RMN em mistura de polissacarídeos de interesse biológico, além de fornecer informações valiosas sobre polímeros de bactérias patogênicas.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, a partir de um protocolo de extração alcalina foi possível obter e caracterizar estruturalmente dois polissacarídeos bacterianos em uma única fração: um polissacarídeo de parede bacteriana, determinado como uma ramnoglucana (contendo ligações do tipo  $\alpha$ -(1,2) e  $\alpha$ -(1,3) na sua cadeia principal de raminose e pontos de ramificação de glucose) e um polissacarídeo de reserva bacteriana, uma glucana (com ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4) na sua cadeia principal de glucose e pontos de ramificação de glucose com ligações do tipo  $\alpha$ -(1,6)) com estrutura química semelhante ao glicogênio.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho propusemos um protocolo de extração para estudo qualitativo de polissacarídeo de parede celular e de polissacarídeo intracelular de *Streptococcus mutans* utilizando ressonância magnética nuclear (RMN). Para a continuidade deste trabalho, uma sugestão pertinente é propor que este protocolo seja validado para análises quantitativas dos polissacarídeos intracelulares por RMN. A validação se daria pela dose-resposta a antimicrobianos, o que potencializaria o estudo de substâncias com potencial anticárie, além de contribuir com um maior entendimento dos polímeros de reserva intracelular na rota metabólica de *S. mutans*.

Outra alternativa relevante para a continuidade deste estudo seria avaliar se a estrutura química dos polissacarídeos de parede celular pode ser alterada na presença de diferentes moléculas. Esta pode ser a chave para desenho de futuros alvos terapêuticos para antimicrobianos, além de ampliar o espectro de entendimento sobre o mecanismo de ação de diversos antibióticos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

AIRES, C. et al. Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1215–1220, 2011.

AIRES, C. P. et al. Effect of a lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ. **Caries Research**, v. 36, n. 3, p. 167–169, 2002.

AIRES, C. P. et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380–386, 2008.

- AIRES, C. P. et al. *Baccharis dracunculifolia*-based mouthrinse alters the exopolysaccharide structure in cariogenic biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 301–307, 2016.
- AJDIĆ, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14434–14439, 2002.
- BERMAN, K. S.; GIBBONS, R. J.; NALBANDIAN, J. Localization of intracellular polysaccharide granules in *Streptococcus mitis*. **Archives of Oral Biology**, v. 12, n. 10, p. 1133–1138, 1967.
- BOWEN, W. H. et al. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 229–242, 2018.
- BRUST, H.; ORZECOWSKI, S.; FETTKE, J. Starch and glycogen analyses: methods and techniques. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, p. 1020, 2020.
- BUSUIOC, M. et al. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7315–7322, 2009.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 2, p. 135–141, 2010.
- CEDERGREN, B.; HOLME, T. On the glycogen in *Escherichia coli* B; electron microscopy of ultrathin sections of cells. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 3, p. 70–73, 1959.
- CHIBA, A. et al. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 392–403, 2015.
- COSTA OLIVEIRA, B. E. et al. Polysaccharides in bacterial biofilm. In: OLIVEIRA, J. M.; RADHOUANI, H.; REIS, R. L. (Eds.). **Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–26.
- COSTA OLIVEIRA, B. E. et al. The route of sucrose utilization by *Streptococcus mutans* affects intracellular polysaccharide metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 636684, 2021.
- COSTA OLIVEIRA, B. E.; CURY, J. A.; RICOMINI FILHO, A. P. Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181168, 2017.
- 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.
- DE BRUIN, O. M.; BIRNBOIM, H. C. A method for assessing efficiency of bacterial cell disruption and DNA release. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 197, 2016.

- 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, 1988.
- DIPERSIO, J. R. et al. Measurement of intracellular iodophilic polysaccharide in two cariogenic strains of *Streptococcus mutans* by cytochemical and chemical methods. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 597–604, 1974.
- DUBOIS, MICHEL. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 182–191, 2004.
- GIBBONS, R. J. Metabolism of intracellular polysaccharide by *Streptococcus mitis* and its relation to inducible enzyme formation. **Journal of Bacteriology**, v. 87, p. 1512–1520, 1964.
- GIBBONS, R. J.; KAPSIMALIS, B. Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. **Archives of Oral Biology**, v. 8, p. 319–329, 1963.
- GOGATE, P. R.; SUTKAR, V. S.; PANDIT, A. B. Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 166, n. 3, p. 1066–1082, 2011.
- IMRAN, B. et al. Removal and recovery of sodium hydroxide (NaOH) from industrial wastewater by two-stage diffusion dialysis (DD) and electrodialysis (ED) processes. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 17, p. 7926–7932, 2016
- KIM, K. et al. Severity of dental caries and risk of coronary heart disease in middle-aged men and women: a population-based cohort study of Korean adults, 2002-2013. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10491, 2019.
- KLEIN, M. I. et al. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 10, 2015.
- KOO, H. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782–789, 2003.
- KOVACS, C. J. et al. *Streptococcus mutans* requires mature rhamnase-glucose polysaccharides for proper pathophysiology, morphogenesis and cellular division. **Molecular Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 944–959, 2019.
- LEMOS, J. A. et al. The biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, 2019.
- MATTOS-GRANER, R. O. et al. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1371–1377, 2000.

MEYER, V. R. CHROMATOGRAPHY | Principles. In: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. (Eds.). **Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 98–105.

MISTOU, M.-Y.; SUTCLIFFE, I. C.; VAN SORGE, N. M. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 464–479, 2016.

NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 891–902, 2009.

NOBRE DOS SANTOS, M. et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Research**, v. 36, n. 5, p. 347–352, 2002.

PAES LEME, A. F. et al. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 878–887, 2006.

PITT, W. G.; HUSSEINI, G. A.; STAPLES, B. J. Ultrasonic drug delivery--a general review. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 1, n. 1, p. 37–56, 2004.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 3, p. 17030, 25 2017.

PRITCHARD, D. G. et al. Characterization of the serotype e polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. **Molecular Immunology**, v. 23, n. 2, p. 141–145, 1986.

PRITCHARD, D. G. et al. Structure of the serotype f polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. **Carbohydrate Research**, v. 166, n. 1, p. 123–131, 1987.

RHODES, C. J. Magnetic resonance spectroscopy. **Science Progress**, v. 100, n. 3, p. 241–292, 2017.

ROGER, P. et al. Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 631–641, 2011.

SASSAKI, G. L. et al. Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1, p. 215–222, 2008.

SEKAR, K. et al. Bacterial glycogen provides short-term benefits in changing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 9, p. e00049-20, 2020.

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

SHEHADUL ISLAM, M.; ARYASOMAYAJULA, A.; SELVAGANAPATHY, P. R. A Review on macroscale and microscale cell lysis methods. **Micromachines**, v. 8, n. 3, p. 83, 2017.

- SHIBATA, Y. et al. Expression and characterization of streptococcal *rgp* genes required for rhamnan synthesis in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2891–2898, 2002.
- SHIBATA, Y.; YAMASHITA, Y.; VAN DER PLOEG, J. R. The serotype-specific glucose side chain of rhamnose-glucose polysaccharides is essential for adsorption of bacteriophage M102 to *Streptococcus mutans*. **FEMS microbiology letters**, v. 294, n. 1, p. 68–73, 2009.
- SOUZA, S. E. et al. Starch combined with sucrose provokes greater root dentine demineralization than sucrose alone. **Caries Research**, v. 52, n. 4, p. 323–330, 2018.
- SPATAFORA, G. et al. A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2556–2563, 1995.
- TENUTA, L. M. A. et al. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. **Caries Research**, v. 40, n. 6, p. 546–549, 2006.
- TSUDA, H. et al. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3756–3764, 2002.
- ÜSTÜN-AYTEKIN, Ö. et al. Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 163–171, 2016.
- VALM, A. M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 16, p. 2957–2969, 2019.
- VAN DER BEEK, S. L. et al. GacA is essential for Group A Streptococcus and defines a new class of monomeric dTDP-4-dehydrorhamnose reductases (RmlD). **Molecular Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 946–962, 2015.
- WILSON, W. A. et al. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 6, p. 952–985, 2010.
- YAO, H.-Y.-Y. et al. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 143, p. 110290, 2021.
- YUAN, B. et al. NMR for mixture analysis: concentration-ordered spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 28, p. 9697–9703, 2021.
- ZHANG, Q. et al. Effect of sodium chloride on the thermodynamic, rheological, and microstructural properties of field pea protein isolate/chitosan complex coacervates. **Food Chemistry**, v. 344, p. 128569, 2021.

