

Artigo

Atividade do Ácido 3,4,5-triacetobenzóico contra a Formação de Biofilmes Bacterianos

Freire, F. E. C.; Honorato, J.; da Silva, D. P.; Gonçalves, R. C.; Menezes, A. C. S.; Naves, P. L. F.*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (3), no prelo. Data de publicação na Web: 21 de junho de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>

Inhibitory Activity of 3,4,5-tris(acetyloxy)benzoic Acid against Bacterial Biofilms Formation

Abstract: The 3,4,5-Tris(acetyloxy)benzoic acid produced from the esterification reaction of 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (Gallic acid) represents a complementary alternative to the available antimicrobial arsenal against pathogenic microorganisms, especially those biofilm formers. Biofilms difficults the action of antimicrobials and promotes resistance to classical antimicrobial and possible therapeutic failures. Strategies such as the derivation of naturally occurring compounds and study of the impact of these changes on the biological actions are taken in order to increase the efficacy and reduce the toxicity of the derivatives from the formation of microbial biofilms, as these play an important role in recalcitrant infectious of the difficult control. Based on the above, were studied the synthesis and derivation of 3,4,5-tris(acetyloxy)benzoic acid, the toxicity of the compound to the test against *Artemia salina* and the antimicrobial and inhibitory activities of biofilm formation *in vitro* by the following bacterial strains: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Escherichia coli* ATCC 25312, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 and *Kocuria rhizophila* ATCC 9341. The results showed that the efficiency of synthesis were 73%, which compound showed antimicrobial activity and moderate toxicity and 1000 µg.mL⁻¹ of 3,4,5-tris(acetyloxy)benzoic acid inhibited biofilm formation by all the studied bacteria, which highlights the capability of the compound in inhibition of this important microbial virulence factor.


Keywords: 3,4,5-tris(acetyloxy)benzoic; biofilm formation; antimicrobial activity.

Resumo

O ácido 3,4,5-triacetobenzóico produzido a partir da esterificação do ácido 3,4,5-triidroxibenzóico (ácido gálico) representa uma alternativa complementar ao arsenal disponível para o controle de micro-organismos patogênicos, notadamente aqueles formadores de biofilmes microbianos. Os biofilmes dificultam a ação dos agentes antimicrobianos e promovem a resistência aos antimicrobianos clássicos e a possíveis falhas terapêuticas. Estratégias como a derivação de compostos de origem natural e estudo do impacto destas modificações nas atividades biológicas são adotadas com o intuito de aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade dos derivados contra a formação de biofilmes microbianos, pois estes desempenham um papel relevante no contexto das doenças infecciosas recalcitrantes e de difícil controle. Com base no exposto, foram estudadas a síntese e derivação do ácido 3,4,5-triacetobenzóico, a toxicidade do composto com o ensaio contra *Artemia salina* e as atividades antimicrobianas e inibitória da formação de biofilme *in vitro* pelas seguintes cepas-padrão bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Escherichia coli* ATCC 25312, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341. Os resultados encontrados demonstraram que o composto apresentou toxicidade e atividade antimicrobiana moderada e que 1000 µg.mL⁻¹ do ácido 3,4,5-triacetobenzóico inibiu a formação de biofilme por todas as bactérias estudadas, fato que reforça a potencialidade do composto na inibição deste importante fator de virulência microbiano.

Palavras-chave: ácido 3,4,5-triacetobenzóico; formação de biofilme; atividade antimicrobiana.

* Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Bioensaios, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR153 nº 3.105, Fazenda Barreiro do Meio, Caixa Postal: 459, CEP 75132-903, Telefone: (62)3328-1161, Anápolis-GO, Brasil.

 plinionaves@ueg.br

DOI:

Atividade do Ácido 3,4,5-triacetobenzóico contra a Formação de Biofilmes Bacterianos

Filipe E. C. Freire,^a João H. de A. Neto,^b Diego P. da Silva^a, Randys C. Gonçalves,^a Antônio Carlos S. Menezes,^c Plínio Lázaro F. Naves^{a,*}

^a Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Bioensaios, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR153 nº 3.105, Fazenda Barreiro do Meio, Caixa Postal: 459, CEP 75132-903, Telefone: (62)3328-1161, Anápolis-GO, Brasil.

^b Universidade Federal de São Carlos, Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química, Rodovia Washington Luis, km 235, CEP 13565-905, Caixa Postal: 676, Telefone: (16)3351-8285, São Carlos-SP, Brasil.

^c Universidade Estadual de Goiás, Laboratório de Química de Produtos Naturais, BR153 nº 3.105, Fazenda Barreiro do Meio, Caixa Postal: 459, CEP 75132-903, Telefone: (62)3328-1161, Anápolis-GO, Brasil.

* plinionaves@ueg.br

Recebido em 1 de novembro de 2017. Aceito para publicação em 11 de junho de 2018

1. Introdução

2. Material e Métodos

- 2.1. Síntese química do ácido 3,4,5-triacetobenzóico
- 2.2. Ensaio de letalidade de *Artemia salina*
- 2.3. Determinação da concentração mínima inibitória 50% (CMI₅₀)
- 2.4. Inibição da formação de biofilme bacteriano

3. Resultados e discussão

4. Conclusão

1. Introdução

Vários micro-organismos patogênicos podem sobreviver tanto na forma planctônica como na sésil. As células isoladas flutuantes ou de vida livre são as formas planctônicas enquanto que as células sésseis são denominadas como biofilmes e são caracterizadas pela vida em grupo,

constituindo um agregado de células microbianas encapsuladas por uma matriz polimérica altamente hidrofóbica, imobilizadas a um suporte ou superfície.¹

A formação e adesão de biofilmes bacterianos a superfícies representam um papel significativo na etiologia de doenças infecciosas de difícil tratamento, pois crescendo de forma sésil os micro-organismos costumam ser muito mais

resistentes aos tratamentos antimicrobianos.^{2,3}

O fenômeno da resistência dos microorganismos patogênicos aos antimicrobianos tem incentivado a investigação de terapias complementares ao arsenal disponível de drogas convencionais e a busca destas alternativas constitui-se em um interessante campo de estudo, sobretudo com a investigação da atividade antimicrobiana de compostos naturais ou de derivados.⁴

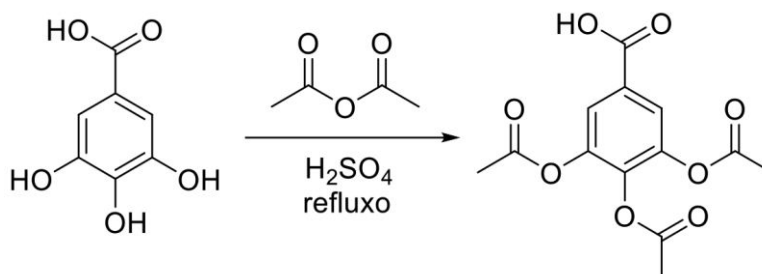
A pesquisa de fármacos inovadores é um crescente desafio para a indústria farmacêutica, fato esse que pode ser corroborado pela diminuição do número de novas moléculas lançadas nos últimos anos. A modificação de moléculas com propriedades conhecidas, visando alterar suas propriedades físico-químicas e ampliar seu espectro de aplicabilidade terapêutica, torna-se então uma opção viável.⁵

Alguns estudos já demonstraram que os derivados do ácido gálico ou ácido 3,4,5-

triidroxibenzóico apresentam potencialidade terapêutica, como sequestradores de espécies reativas de oxigênio e considerável atividade antimicrobiana.^{6,7}

As sínteses de esterificação de álcoois são reações amplamente aplicadas na indústria química e em experimentos cotidianos de síntese orgânica. A esterificação do ácido gálico (Figura 1), descrita por Jene e Ibers,⁸ foi feita primeiramente visando o aumento do rendimento das sínteses de galatos de alquila, uma vez que as sínteses convencionais possuíam baixo rendimento, principalmente devido à alta reatividade das hidroxilas do anel.

Assim, a proteção das hidroxilas do anel através da esterificação, para uma posterior esterificação do grupo carboxílico, tornou-se um método de maior viabilidade na síntese de galatos de alquila, que são compostos amplamente estudados devido suas promissoras atividades antifúngicas e antibacterianas.^{9,10}



Esquema 1. Reação de esterificação do ácido gálico

As derivações químicas, como a esterificação das hidroxilas do ácido gálico, podem modificar atributos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, por meio da alteração da solubilidade, coeficiente de partição e do grau de ionização, podendo elevar a potencialidade terapêutica de compostos inovadores e potenciais fármacos.^{11,12}

Com base no exposto, objetivou-se sintetizar o ácido 3,4,5-TAB e avaliar a toxicidade, a atividade antimicrobiana e inibitória da formação de biofilme por cepas bacterianas.

2. Material e Métodos

2.1. Síntese química do ácido 3,4,5-triacetobenzóico

O ácido 3,4,5-triidroxibenzóico (5,0g – 29mmol) (Sigma-Aldrich, Brasil) foi dissolvido em anidrido acético em meio acidificado com ácido sulfúrico concentrado. O recipiente foi então aquecido em banho-maria (60°C) com agitação constante por aproximadamente 30 minutos e após o resfriamento adicionou-se

água destilada à mistura. Com a adição de água, houve formação de precipitado branco o qual foi separado por meio de filtração por pressão negativa (à vácuo) e seco sob pressão reduzida.

A purificação do ácido 3,4,5-triacetobenzóico foi realizada por recristalização, onde primeiramente dissolveu-se em metanol e obteve-se uma mistura homogênea, sendo a mesma deixada em repouso durante 3 dias. Após a evaporação natural do solvente, obteve-se 6,4g do produto purificado (73% de rendimento).

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H foi obtido em um equipamento DRX400-Bruker (9.4 Tesla) e o espectro de absorção na região do infravermelho foi gerado empregando-se o método de pastilha (em KBr anidro) em um espectrofotômetro Bomem Michelson FT, Modelo MB-102.

2.2. Ensaio de letalidade de *Artemia salina* Leach

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Moline-Salinas e Said-Fernández¹³ com algumas adaptações, foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho em água destilada (40 g.L^{-1}) suplementado com extrato de leveduras e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na_2CO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os cistos foram incubados por 36 horas no meio com iluminação natural, com temperatura ambiente e oxigenação constante.

Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz pipetados e transferidos para uma placa de Petri com o meio fresco. O bioensaio foi realizado em microplaca de poliestireno de 96 poços com as seguintes concentrações: 1200, 600, 300, 150 e $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ácido 3,4,5-triacetobenzóico. Os náuplios foram distribuídos na placa de forma padronizada.

Foram incluídos nos ensaios, controles negativos e de letalidade utilizando diluições seriadas de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Os resultados permitiram o cálculo da concentração letal a 50% das larvas (CL_{50}) pelo método Probit, no programa *Statplus 2009 professional (AnalystSoft)*. Os valores de CL_{50} dos compostos isolados e em combinação foram submetidos ao teste de t de *Student* pareado para se averiguar a significância das diferenças observadas entre a toxicidade dos compostos.

2.3. Determinação da concentração mínima inibitória 50% (CMI_{50})

Foram utilizados para determinação da concentração mínima inibitória dos compostos, os protocolos de microdiluição em caldo padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI M7-A9, 2012)*¹⁴ contra os seguintes micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Escherichia coli* ATCC 25312, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, todas as cepas foram mantidas em condições de congelamento.

Em resumo, as suspensões de células bacterianas foram preparadas a partir de culturas recentes em ágar Mueller Hinton segundo os protocolos de referência. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) até atingir as cinco concentrações diferentes utilizadas no ensaio ($1000, 250, 62,5, 15,62$ e $3,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

As leituras dos testes para as bactérias foram realizadas após 24 horas de incubação a 35°C . Os controles de crescimento foram adicionados, um contendo ágar Mueller Hinton e outro contendo meio ágar Mueller Hinton adicionado de 5% (v/v) de DMSO, sendo esta a quantidade referente à maior concentração de DMSO no meio de teste.

As leituras foram realizadas considerando

a CMI₅₀ como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano em ao menos 50% quando comparado aos controles sem antimicrobianos, por meio de leitura da densidade óptica dos poços. Ampicilina foi utilizada como controle para validação da técnica segundo Pantanella e colaboradores.¹⁵

2.4. Inibição da formação de biofilme bacteriano

Nos ensaios de avaliação de biomassa na formação de biofilme e atividade metabólica foi definida a concentração de 1000 µg.mL⁻¹ do ácido 3,4,5-triacetobenzóico, as microplacas foram incubadas a 35,5°C por 24 horas e após este período procedeu-se a leitura visual da turvação. Após a leitura visual, as placas foram processadas pelas técnicas do cristal violeta para os ensaios de biomassa total e da resazurina para os estudos da atividade metabólica.

Na técnica do cristal violeta, as placas foram tratadas segundo metodologia descrita por Naves e colaboradores,¹⁶ com a determinação do crescimento total (CT) pela medida da densidade óptica seguida da remoção do caldo crescido com as formas planctônicas. Posteriormente as amostras foram coradas com cristal violeta a 1%, o corante foi desprezado e as placas lavadas com água destilada. Após esse período as densidades ópticas (DO) foram lidas a 492nm dos poços com bactérias aderidas (BA) e poços controle (PC).

Para a detecção da atividade metabólica das células associadas ao biofilme, os micro-organismos foram incubados da mesma maneira que para o ensaio anteriormente descrito com a remoção posterior do caldo crescido dos poços, com a lavagem dos poços e adição do corante vital resazurina a 10 µg.mL⁻¹ e incubação das microplacas por duas horas a 35,5°C.

Posteriormente foi realizada a leitura das DO_{492nm} e DO_{630nm} e a atividade metabólica foi determinada pelo cálculo da extinção molar

da resazurina, dada pela seguinte fórmula $(PT_{492nm} - ((PT_{630nm} \times FC_{630nm}) / (CP_{492nm} - (CP_{630nm} \times FC_{630nm}))) \times 100$, aonde, PT = DO dos Poços-Teste, FC = DO do Fator de Correção e CP = DO dos controles positivos.

2.5. Análises estatísticas

Para análise da formação de biofilme pelas cepas foi realizado um teste t de *Student* pareado para comparar o impacto do ácido 3,4,5-triacetobenzóico na formação de biofilme bacteriano, tanto para a biomassa total quanto para atividade metabólica nos ensaios.

3. Resultados e discussão

Através dos experimentos de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de carbono (¹³C) e hidrogênio (¹H) pode-se confirmar a estrutura obtida para o composto. No espectro de infravermelho do ácido 3,4,5-triacetobenzóico destacam-se bandas características em 3086 (cm⁻¹) (O-H de ácido carboxílico), 3011 (ν_{C_{sp2}-H} anel aromático), 2874 (ν_sCH₃ acetila), 1790 (ν_sC=O acetila), 1769 (ν_{C-O-H} fora do plano), 1697 (ν_{as}COO⁻ acetila), 1670, 1584, (ν_{C=C} aromático), 1432 (δ_{as}CH₃ acetila) e 1184 (ν_sCOO⁻ acetila). Todos os estiramentos encontrados evidenciam as ligações dos grupos funcionais do ácido sintetizado.¹⁷⁻¹⁸

No espectro de RMN ¹H (Figura 2) observa-se a presença de quatro singletos, onde o primeiro sinal em δ_H 7,88 na região de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos; integrado para dois hidrogênios equivalentes, refere-se aos hidrogênios ligados ao anel aromático na posição *orto* em relação a função ácida. O sinal em δ_H 7,28 refere-se a hidrogênio ligado a carbono do solvente (CDCl₃), indicando a presença de uma pequena quantidade de solvente não deuterado. O terceiro sinal em δ_H 2,33; integrado para três hidrogênios, refere-se aos

hidrogênios da metila do grupo acetila na posição *para* em relação ao ácido carboxílico, estes três hidrogênios possuem um maior deslocamento por estarem entre os grupos acetila em *meta*, posição de maior

impedimento estérico. E o quarto sinal em δ_H 2,27; integrado para seis hidrogênios, refere-se aos hidrogênios ligados os carbonos das metilas nos grupos acetilas em posição *para* em relação ao ácido carboxílico.

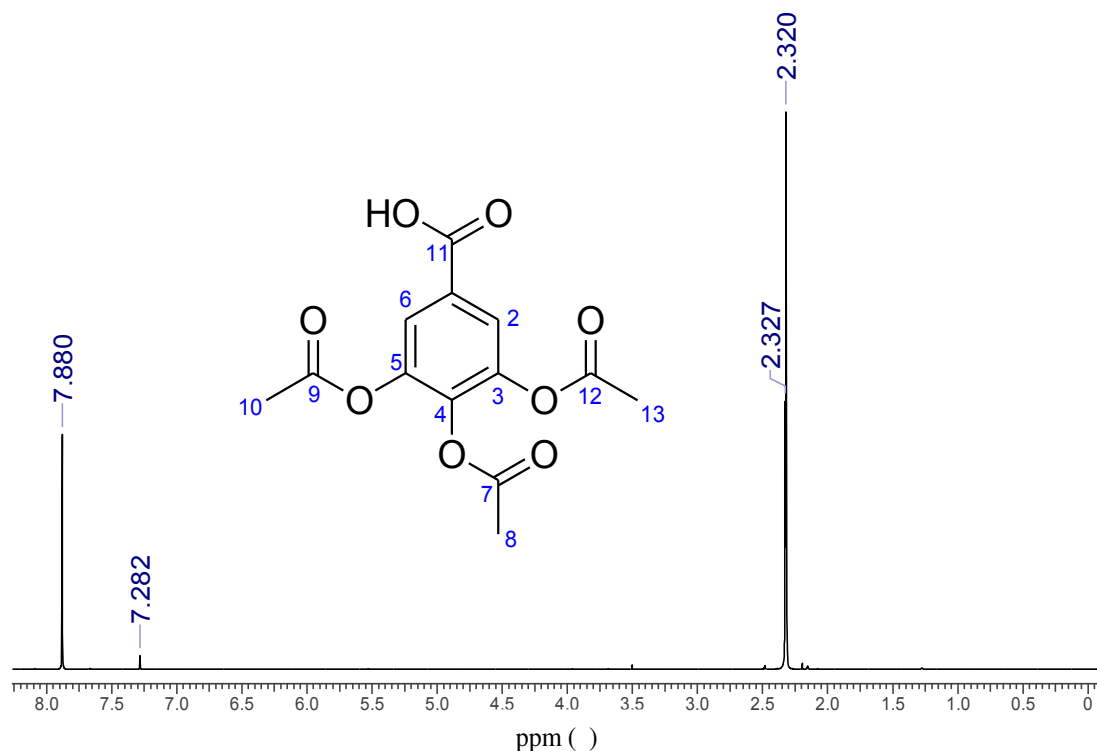


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3

No espectro de ^{13}C RMN (Figura 3), a estrutura do produto proposto é comprovada pela presença do sinal em δ_c 169,58 referente ao carbono 11, o sinal δ_c 167,68, referente aos carbonos 9 e 12, em δ_c 166,45, referente ao carbono 7, o sinal em δ_c 143,52 e δ_c 122,83, referente aos carbonos 5 e 3, 6 e 2 respectivamente, em δ_c 139,35 e δ_c 127,46, referentes aos carbonos 4 e 1 respectivamente. Os sinais em δ_c 77,39; δ_c

77,08 e δ_c 76,75 são referentes ao carbono do solvente (clorofórmio), o sinal em δ_c 20,55, referente aos carbonos 13 e 10 e o sinal em δ_c 20,16, referente ao carbono 08. Em ambos os espectros (^1H e ^{13}C) a ótima definição dos picos e a ausência de ruídos na linha de base mostra que o ácido obtido está puro. Todas as atribuições (RMN e IR) foram dadas conforme descrito na literatura.^{19,20}

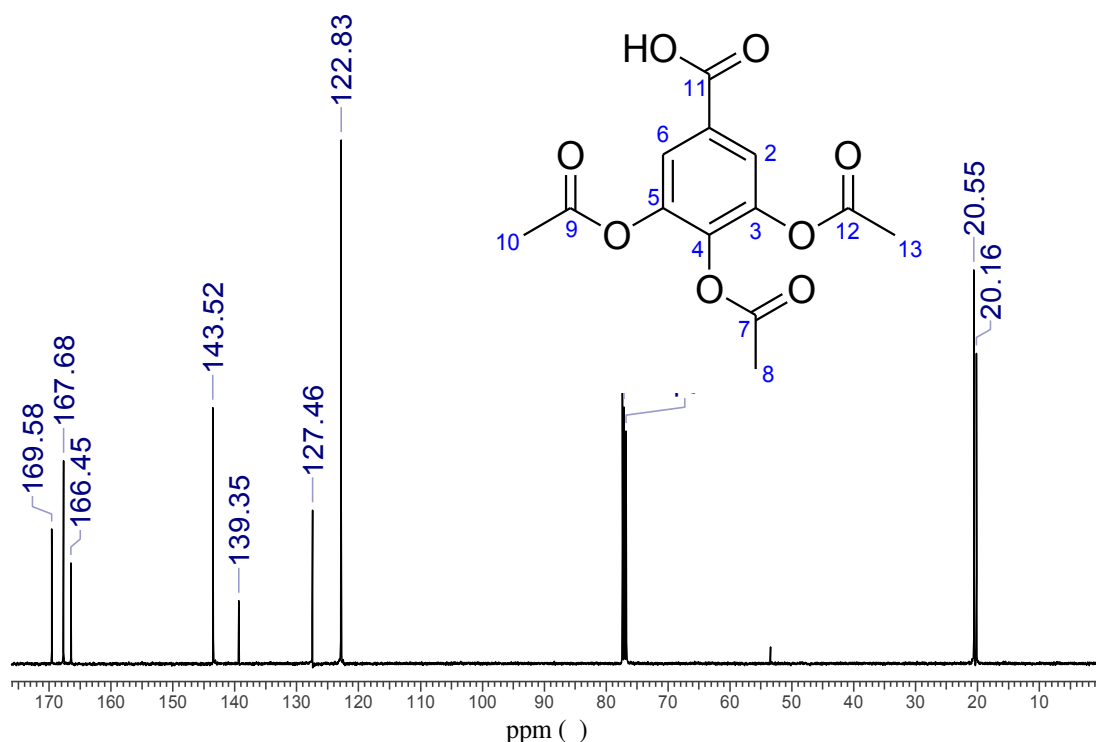


Figura 2. Espectro de RMN de ¹³C em CDCl₃

O ácido 3,4,5-triacetobenzóico apresentou toxicidade moderada com CL₅₀ de 481,69 µg.mL⁻¹. Nguta e colaboradores²¹ consideram alta toxicidade para compostos com valores de CL₅₀ até 100 µg.mL⁻¹, toxicidade moderada para CL₅₀ entre 100 e 500 µg.mL⁻¹ e toxicidade baixa para CL₅₀ entre 500 µg.mL⁻¹ e 1000 µg.mL⁻¹, e não tóxico acima de 1000 µg.mL⁻¹.

Segundo Costa e colaboradores,²² compostos com CL₅₀ < 200 µg.mL⁻¹ apresentam potencial também para atividades antimicrobiana e antitumoral. O composto avaliado apresentou toxicidade moderada segundo os critérios destes outros autores.

O ensaio de letalidade de *Artemia salina* é utilizado em estudos de novas moléculas bioativas, pois em geral, estes compostos são tóxicos às larvas e este teste preliminar se caracteriza por ser rápido, confiável e simples

na determinação preliminar da bioatividade de compostos durante o isolamento de produtos naturais, sendo a análise expressa em CL₅₀.^{23,24}

Foram observadas CMI₅₀ somente para as cepas *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 com sensibilidade ao composto nas concentrações de 62,5 µg.mL⁻¹ e 15,6 µg.mL⁻¹, ainda que não tenha sido observado um efeito dose-dependente.

Os principais micro-organismos formadores de biofilme foram *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, respectivamente.

A comparação entre as leituras de densidade óptica dos controles na ausência do ácido 3,4,5-TAB e na presença está mostrada na Figura 4.

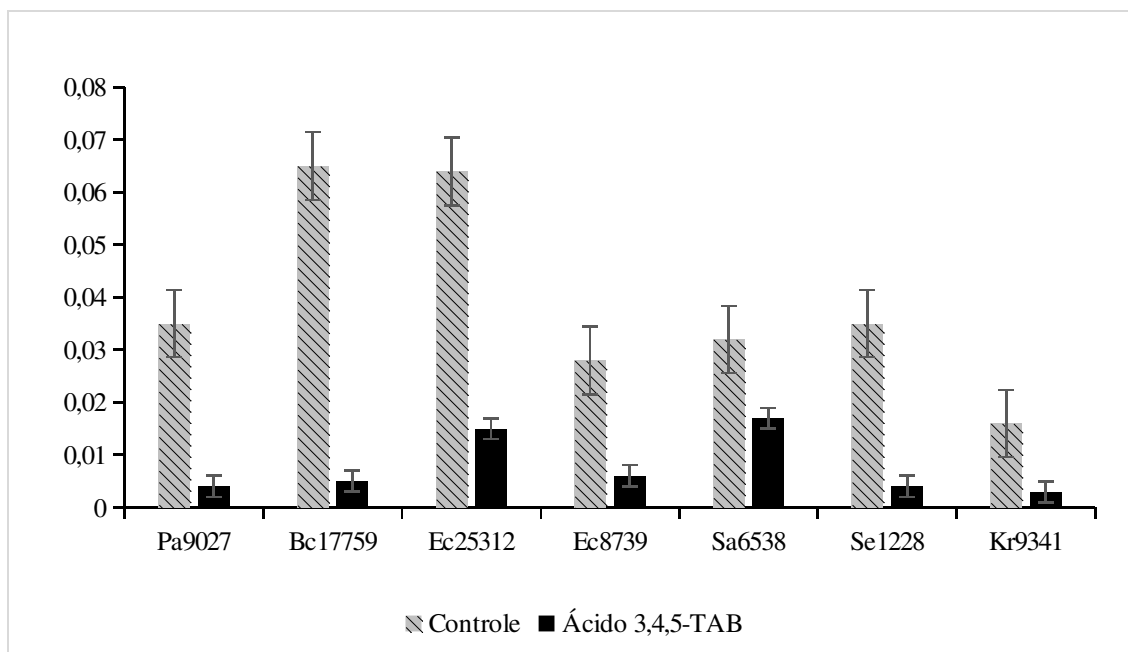


Figura 4. Biomassa formada pelos biofilmes bacterianos na ausência (controle) e em presença de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do ácido 3,4,5-TAB

Foi notável o impacto do ácido 3,4,5-triacetobenzóico na inibição da formação do biofilme por todas as cepas estudadas. De fato, todas as diferenças entre os resultados foram significativas, com $P < 0,0001$, demonstrando a eficácia do composto contra a formação do biofilme e na atividade metabólica das bactérias aderidas.

O ensaio utilizando o corante resazurina detectou que todas as cepas estudadas mantiveram o metabolismo diminuído mais de 50% na presença do ácido 3,4,5-triacetobenzóico em relação aos controles sem o composto (Tabela 1).

Tabela 1. Redução do metabolismo com a presença do ácido 3,4,5-triacetobenzóico

Cepas	Redução da atividade metabólica (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	56,99
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	89,17
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25312	53,29
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	58,19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	86,74
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1228	90,16
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	57,76

Houve uma queda acentuada no metabolismo das bactérias associadas ao biofilme cepas estudadas como pode ser observado na Figura 5 a seguir. As bactérias

Staphylococcus epidermidis ATCC 1228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 apresentaram reduções acima de 80%.

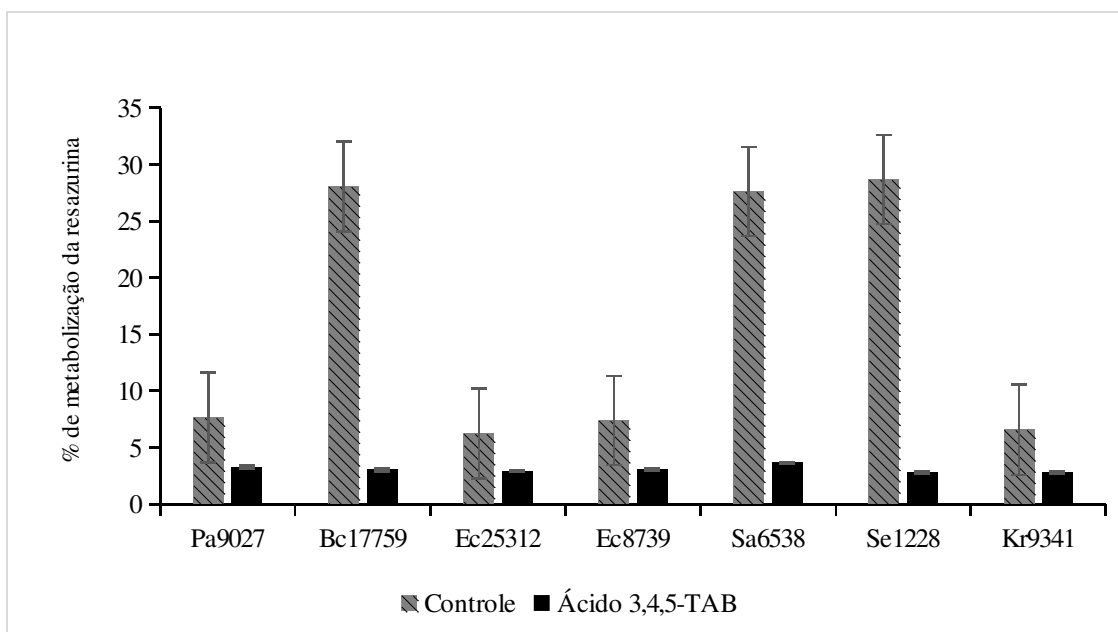


Figura 5. Porcentagem do metabolismo das células viáveis associadas ao biofilme bacteriano na ausência (controle) e em presença de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ácido 3,4,5-TAB

Apesar do *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ter apresentado a menor inibição da biomassa formada no biofilme, mostrou uma expressiva redução da taxa metabólica das células sésseis pelo ácido 3,4,5-triacetobenzóico.

Sabe-se que o ácido 3,4,5-TAB é um composto lipofílico, com coeficiente de partição água/n-octanol ($\log P$) da ordem de 0,2417.⁹ Considerando que compostos lipofílicos possuem alta permeabilidade em paredes celulares bacterianas, essa característica observada no composto aumenta sua biodisponibilidade para as células bacterianas. Uma vez que o 3,4,5-TAB pode permear a parede celular, é possível que haja atuação no meio intracelular, interagindo com moléculas do metabolismo bacteriano, desencadeando mecanismos que levam a diminuição da proliferação bacteriana, ou até mesmo mecanismos a morte celular, justificando assim os valores de inibição do crescimento bacteriano encontrados.²⁵

4. Conclusão

Em resumo, após a modificação química realizada no ácido 3,4,5-triidroxibenzóico e obtenção do ácido triacetobenzóico, foi detectado que o composto derivado apresentou toxicidade moderada, discreta ação antimicrobiana contra o crescimento das bactérias na forma planctônica, pois foram detectadas CMI_{50} apenas contra dois dos micro-organismos estudados (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341) e uma significativa ação contra a formação de biofilmes em todas as bactérias estudadas.

Os resultados encontrados, tanto na inibição da biomassa como do metabolismo das bactérias associadas ao biofilme, por $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do ácido 3,4,5-TAB, comprovam a eficácia anti-biofilme do composto ressaltando a sua potencialidade no controle de micro-organismos pela inibição deste importante fator de virulência microbiano.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, a Universidade Estadual de Goiás pela concessão de bolsas de Mestrado para o primeiro e o segundo autor e ao Programa de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP).

Referências Bibliográficas

- ¹ Menoita, E.; Santos, V.; Testas, C.; Gomes, C.; Santos, A. Biofilms: Knowing the Entity. *Journal of Aging & Innovation* **2012**, *1*, 23. [Link]
- ² Culler, H. F. *Formação de biofilme por Escherichia coli enteropatogênica atípica*. Dissertação de Pós graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2010. [Link]
- ³ Phillips, P. L.; Wolcott, R. D.; Fletcher, J.; Schultz, G. S. Biofilms made easy. *Wounds International* **2010**, *1*, 1. [Link]
- ⁴ Guimarães, D. O. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova* **2010**, *33*, 667. [CrossRef]
- ⁵ Calixto, J. B. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia* **2008**, *1*, 98. [Link]
- ⁶ Božič, M.; Gorgieva, S.; Kokol, V. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 2388. [CrossRef]
- ⁷ Al-Zahrani, S. H. M. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of American Science* **2012**, *8*, 7. [Link]
- ⁸ Jene, P. G.; J. A. Ibers. "Model porphyrin precursors: 1,2,4,5-tetrakis (cyanomethyl) benzene, methyl 3,4,5-triacetoxybenzoate and 2-(N-phthalimidomethyl)benzoic acid." *Acta Crystallographica Section C* **2000**, *56*, 246. [Link]
- ⁹ Leal, P. C.; Mascarello, A.; Derita, M.; Zuljan, F.; Nunes, R. J.; Zacchino, S.; Yunes, R.A. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *15*, 1793. [CrossRef]
- ¹⁰ Kaur, R.; Kaur, K.; Gupta, L.; Dhir, N.; Gaganpreet. Synthesis and Biological Evaluation of Gallic acid Peptide Derivatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2014**, *28*, 16. [Link]
- ¹¹ Alves, C. Q.; *Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de Cenostigma gardnerianum Tul. (Leguminosae)*. Universidade Federal da Bahia, **2007**. [Link]
- ¹² Barbosa, V. F.; *Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo*. Universidade Estadual Paulista, **2010**. [Link]
- ¹³ Molina-Salinas, G. M; Said-Fernandez, S. A. Modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline* **2006**, *3*, 633. [Link]
- ¹⁴ Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard M7-A9 **2012**, *32*, 1. [Link]
- ¹⁵ Pantanella, F.; Valenti, P., Natalizi, T.; Passeri, D.; Berlutti, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene, Medicina Preventiva e di Comunità* **2013**, *25*, 31. [PubMed]
- ¹⁶ Naves, P.; Prado, G.; Huelves, L.; Gracia, M.; Ruiz, V.; Blanco, J.; Dhahi, G.; Blanco, M.; Ponte, M.C.; Soriano, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis* **2008**, *45*, 86. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Silverstein, R. M.; Bassler, G.; Terence C. *Identificação Espectrométrica de Compostos*

Orgânicos, 5^a. ed., Guanabara & Koogan: Rio de Janeiro, **2004**. [[Link](#)]

¹⁸ Govindasamy, P.; Gunasekaran S.; and Srinivasan S. Molecular geometry, conformational, vibrational spectroscopic, molecular orbital and Mulliken charge analysis of 2-acetoxybenzoic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *130*, 329. [[CrossRef](#)]

¹⁹ Gottlieb, H. E.; Kumar, S.; Sahai, M.; Ray, A. B. Ethyl brevifolin carboxylate from *Flueggea microcarpa*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2435. [[CrossRef](#)]

²⁰ Rouhi-Saadabad, H; Akhlaghinia, B. Direct, rapid and convenient synthesis of esters and thioesters using PPh₃/N-chlorobenzotriazole system. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2014**, *25*, 253. [[CrossRef](#)]

²¹ Nguta, J. M.; Mbaria, J. M.; Gakuyab, D. W.; Gathumbic, P. K.; Kabasad, J. D.; Kiamae, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia Salina* L. (Artemiidae). *Pharmacologyonline* **2011**, *2*, 458. [[Link](#)]

²² Costa, E. S. S.; Dolabela, M. F.; Póvoa, M. M.; Oliveira, D. J.; Müller, A. H. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 834. [[CrossRef](#)]

²³ Rahman, A.; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J.; *Bioassay Techniques for Drug Development*, 1^a. ed., Taylor & Francis e-Library: Singapore, 2005. [[Link](#)]

²⁴ ²⁴ Nascimento, J. E.; Melo, A. F. M., Lima e Silva, T.C.; Veras Filho, J.; Santos, E.M.; Albuquerque, U.P.; Amorim, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada* **2008**, *29*, 145. [[Link](#)]

²⁵ Pliška, V.; Testa, B.; Waterbeemd, H.V. *Lipophilicity in drug action and toxicology*, 1^a ed., VCH: Weinheim, **1996**. [[Link](#)]