



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Sabrina Marcela Ribeiro**

**Efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *Casearia sylvestris* contra  
biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans***

**Araraquara**

**2023**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Sabrina Marcela Ribeiro**

**Efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *Casearia sylvestris* contra biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans***

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marlise Inêz Klein Furlan**  
**Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro**

**Araraquara**

**2023**

R484e Ribeiro, Sabrina Marcela  
Efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *Casearia sylvestris* contra biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans* / Sabrina Marcela Ribeiro. -- Araraquara, 2023  
150 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara  
Orientadora: Marlise Inêz Klein Furlan  
Coorientador: Alberto José Cavalheiro

1. Casearia. 2. Biofilmes. 3. Streptococcus mutans. 4. Matriz Extracelular. 5. Durapatita. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**SABRINA MARCELA RIBEIRO**

**Efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *Casearia sylvestris* contra biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans***

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral**

Presidente e orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marlise Inêz Klein Furlan

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lívia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof. Dr. Bruno Bueno Silva

4º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Patrícia Aires

Araraquara, 03 de fevereiro de 2023.

## **DADOS CURRICULARES**

### **SABRINA MARCELA RIBEIRO**

NASCIMENTO: 14 de janeiro de 1992 – Sertãozinho – São Paulo

FILIAÇÃO: Cláudia Helena Alves Ribeiro e Marcelo Roberto Ribeiro

2012/2016 Curso de Graduação em Odontologia  
Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2017/2019 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado  
Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2019/2021 Curso de Especialização em Prótese dentária  
Faculdade Herrero, Araraquara- Brasil

2019/2023 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral,  
nível Doutorado  
Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

“Dedico todo o esforço que depositei neste trabalho aos meus avós, Moisés e Olga (*in memoriam*), que foram exemplos de caráter e dignidade”.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marcelo e Cláudia, meus companheiros e melhores amigos, que estiveram presentes em todos os momentos e nunca mediram esforços para minha formação;

À minha avó Maria Helena, pelo amor, carinho e orações;

Ao meu marido Érick, que esteve ao meu lado em todos os momentos, muito obrigada pelo companheirismo, amor, atenção e carinho;

À minha querida orientadora Marlise, pela competência, dedicação e pelas oportunidades concedidas à minha formação;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro do departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual de São Paulo - UNESP e à Paula Bueno da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração e parceria essencial para o desenvolvimento deste trabalho;

Às professoras Livia Nordi Dovigo e Josimeri Hebling Costa, por gentilmente participarem da minha banca de pré-qualificação e de qualificação do doutorado;

Aos professores Bruno Bueno Silva, Livia Nordi Dovigo e Carolina Patrícia Aires por gentilmente aceitarem o convite para membros titulares da banca de defesa da tese do doutorado;

Aos professores Janaina Habib Jorge, Cássio do Nascimento e Carlos Henrique Gomes Martins por gentilmente aceitarem o convite para membros suplentes da banca de defesa da tese do doutorado;

Ao professor Glaucius Oliva, coordenador do CIBFar - Centro de Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CEPID/FAPESP) e à professora Vanderlan da Silva Bolzani, Coordenadora do INCT BioNat;

Aos Laboratório de Microbiologia Aplicada, de Biologia Molecular e de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura do Instituto de Química, Araraquara da Universidade Estadual Paulista (Unesp);

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001;

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Bolsa de doutorado – Processo nº 2019/23175-7) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa;

Às técnicas Jaqueline da Silva Colin e Karen Anielli, pela colaboração;

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, em nome do diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e a vice-diretora Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, responsáveis pela gestão e apoio a todos os alunos;

À pós-graduação em Odontologia, em nome do coordenador Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri;

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, especialmente do Departamento de Materiais e Prótese, pela disposição em ajudar os alunos;

Ao grupo de pesquisa (Carmélia Isabel Lobo Vitorino, Élkin Jair Florez Salamanca, Guilherme Roncari Rocha, Ana Carolina Urbano e todos os alunos de Iniciação científica) pela troca de conhecimento.

“Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.”  
Arthur Schopenhauer\*

---

\* Schopenhauer A. Parerga and paralipomena: short philosophical essays. Cambridge: Cambridge University Press; 2016.

Ribeiro SM. Efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *Casearia sylvestris* contra biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans* [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

## RESUMO

Este estudo *in vitro* avaliou o efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *Casearia sylvestris* (de amostras coletadas em três cidades, contemplando os Biomas Atlântico e Cerrado; variedades *sylvestris*, *lingua* e intermediária) no controle do biofilme cariogênico de *Streptococcus mutans*. Primeiro, foram avaliados os efeitos antimicrobiano (cultura planctônica) e antibiofilme (biofilmes iniciais e pré-formados) contra *S. mutans* em modelos de exposição prolongada (24 horas) via viabilidade da população bacteriana (unidades formadoras de colônias-UFC/mL). Em segundo lugar, os tratamentos eficazes em biofilmes (iniciais e pré-formados) foram usados para preparar soluções (com e sem fluoreto de sódio e testados quanto ao efeito tópico (breve exposição) em biofilmes de *S. mutans* cultivados em discos de hidroxiapatita revestidos com saliva. Terceiro, os tratamentos selecionados (com efeito em biofilmes iniciais e pré-formados) foram avaliados através da curva de inibição do crescimento de *S. mutans* associada à expressão gênica e análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A caracterização química das frações foi realizada via cromatografia. Nenhum extrato bruto mostrou atividade antimicrobiana. Nos biofilmes iniciais, as frações de acetato de etila (AcOEt) e etanólica (EtOH) de Brasília (BRA/DF; 250 µg/mL) reduziram em média 8- e 6-logs vs. veículo, respectivamente, e as frações preparadas por extração em fase sólida (EFS-C18) de Presidente Venceslau/SP (Água/EtOH 60:40 e Água/EtOH 40:60; 500 µg/mL), reduziram em média 6- e 8-logs vs. veículo, respectivamente. Entre as moléculas (Flavonoide 4, Caseargrewiina F ou CsF, Casearinas X e J), apenas CsF (125 µg/mL), reduziu a contagem de células viáveis de biofilmes pré-formados (5 logs vs. veículo). No entanto, para efeito tópico, nenhuma solução afetou os componentes do biofilme (população viável, biomassa, componentes da matriz extracelular e organização estrutural). O perfil de sobrevivência durante o ensaio de inibição do crescimento diferiu entre CsF e AcOEt\_BRA/DF. Enquanto ambos mataram a bactéria após uma hora, CsF produziu uma recuperação média constante de células sobreviventes ( $\cong$  3,5 logs) até 24h (ou seja, bacteriostático). No entanto, a fração AcOEt\_BRA/DF causou morte celular pronunciada e progressiva sem células recuperadas em 24h (ou seja, bactericida). CsF e AcOEt\_BRA/DF causaram danos irreversíveis às células de *S. mutans* (imagens MEV) e influenciaram a expressão de genes de virulência de *S. mutans*. AcOEt\_BRA/DF reduziu a expressão de *eno* (0,6 vezes) e induziu *nox1* (8 vezes); CsF induziu *gtfB* ( $\geq$  5 vezes). As análises cromatográficas indicam que a fração AcOEt de Brasília/DF contém uma casearina ainda não identificada. Assim, um efeito contra biofilmes de *S. mutans* ocorreu apenas em um modelo de exposição prolongada devido à capacidade bacteriostática e/ou bactericida de uma fração e uma molécula de *C. sylvestris*.

**Palavras – chave:** *Casearia*. Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Matriz Extracelular. Durapatita.

Ribeiro SM. Effect of extracts, fractions and isolated molecules of *Casearia sylvestris* against *Streptococcus mutans* cariogenic biofilm [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

## ABSTRACT

This *in vitro* study evaluated the effect of extracts, fractions, and isolated molecules of *Casearia sylvestris* (of samples collected in different cities, contemplating the Atlantic and Cerrado Biomes; *sylvestris*, *lingua*, and intermediate varieties) to control the cariogenic biofilm of *Streptococcus mutans*. First, the antimicrobial (planktonic culture) and antibiofilm (initial and pre-formed biofilms) effects against *S. mutans* in prolonged exposure (24 hours) models via bacterial population viability (colony-forming units—CFU/mL) were assessed. Next, the effective treatments in biofilms (initial and pre-formed) were used to prepare solutions (with and without fluoride) and tested for the topical effect (brief exposure) in *S. mutans* biofilms grown on saliva-coated hydroxyapatite discs. Lastly, selected treatments were evaluated through the *S. mutans* growth inhibition curve associated with gene expression and scanning electron microscopy (SEM) analyses. The chemical characterization of the fractions was performed via chromatography. No crude extracts showed antimicrobial activity. In early biofilms, the ethyl acetate (AcOEt) and ethanolic (EtOH) fractions from Brasília (BRA/DF; 250 µg/mL) reduced 8- and 6-logs vs. vehicle, respectively, and the fractions prepared by solid phase extraction (SPE-C18) from Presidente Venceslau/SP (Water/EtOH 60:40 and Water/EtOH 40:60; 500 µg/mL), reduced 6- and 8-logs vs. vehicle, respectively. Among the isolated molecules (Flavonoid 4, Caseargrewiin F—CsF, Casearins X and J), only CsF (125 µg/mL) reduced the viable cell counts of pre-formed biofilms (5 logs vs. vehicle). However, none of the solutions presented a topical effect on biofilm components (viable population, biomass, extracellular matrix components, and structural organization). The survival profile during the growth inhibition assay differed between CsF and AcOEt\_BRA/DF. While both killed the bacterium after one hour, CsF yielded a constant mean recovery of surviving cells ( $\cong 3.5$  logs) until 24h (*i.e.*, bacteriostatic). But AcOEt\_BRA/DF caused pronounced and progressive cell death without cells recovered at 24h (*i.e.*, bactericidal). CsF and AcOEt\_BRA/DF caused irreversible damage to *S. mutans* cells (SEM images) and influenced the expression of *S. mutans* virulence genes. AcOEt\_BRA/DF reduced the expression of *eno* (0.6-fold) and induced *nox1* (8-fold); CsF induced *gtfB* ( $\geq 5$ -fold). Chromatographic analyzes indicate that the AcOEt fraction from Brasília/DF contains an unidentified casearin. Thus, an effect against *S. mutans* biofilms occurred only in a prolonged exposure model due to the bacteriostatic and/or bactericidal capacity of a fraction and a molecule from *C. sylvestris*.

**Keywords:** *Casearia*. Biofilms. *Streptococcus mutans*. Extracellular Matrix. Durapatite.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....   | <b>16</b> |
| 2.1 Objetivos Específicos .....   | 16        |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | <b>17</b> |
| 3.1 Cárie Dentária .....  | 17        |
| 3.2 Biofilme Dental .....   | 19        |
| 3.3 A Matriz Extracelular do Biofilme e Seus Constituintes .....  | 21        |
| 3.4 <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 24        |
| 3.5 Estratégias para Controle do Biofilme Cariogênico .....   | 28        |
| 3.6 Produtos Naturais .....   | 33        |
| 3.7 Produtos Naturais no Controle da Cárie Dentária.....  | 36        |
| 3.8 <i>Casearia sylvestris</i> .....  | 43        |
| <br>  |           |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....  | <b>46</b> |
| 4.1 Coleta e Preparo dos Extratos Brutos de <i>C. sylvestris</i> .....  | 46        |
| 4.1.2 Fracionamento dos extratos brutos de <i>C. sylvestris</i> .....   | 48        |
| 4.1.3 Flavonoide e casearinas isolados de <i>C. sylvestris</i> .....  | 51        |
| 4.2 Cepas e Crescimento Microbiano .....  | 52        |
| 4.3 Atividade Antimicrobiana (Cultura Planctônica) Através de<br>Modelo de Longa Exposição (24h) .....                                    | 53        |
| 4.4 Atividade Antibiofilme Através de Modelo de Longa<br>Exposição (24h) .....  | 54        |
| 4.4.1 Atividade contra a formação inicial de biofilme (biofilmes<br>de 24h) .....   | 54        |
| 4.4.2 Atividade contra biofilmes pré-formados (biofilmes de<br>48h) .....   | 55        |
| 4.5 Análise do Efeito de Soluções sobre Biofilmes Formados<br>em Discos de Hidroxiapatita Revestidos com Saliva<br>(Exposição Breve)..... | 56        |
| 4.5.1 Formação de película salivar sobre superfície de<br>hidroxiapatita .....  | 56        |
| 4.5.2 Tratamento da película, formação de biofilmes e<br>tratamento dos biofilmes .....   | 57        |
| 4.5.3 Processamento dos biofilmes e métodos padrão de<br>análises bioquímicas (colorimétricas) e método de cultivo<br>microbiano.....     | 59        |
| 4.5.4 Peso seco insolúvel dos biofilmes .....   | 61        |
| 4.5.5 Quantificação de proteínas totais do biofilme e da matriz ...   | 61        |
| 4.5.6 Quantificação de eDNA na matriz extracelular .....  | 63        |
| 4.5.7 Exopolissacarídeos solúveis em água (WSP) na matriz<br>extracelular.....  | 64        |
| 4.5.8 Exopolissacarídeos insolúveis em água (ASP) na matriz .....   | 65        |
| 4.5.9 Análise via microscopia de fluorescência (confocal) .....   | 66        |

|   |     |
|---|-----|
| 4.6 Curva de Inibição do Crescimento para Tratamentos Selecionados Associado à Análise de MEV e de Expressão Gênica ..... | 67  |
| 4.6.1 Curva de inibição do crescimento .....  | 67  |
| 4.6.2 Preparo das culturas para análises de MEV .....   | 68  |
| 4.6.3 Inibição do crescimento por compostos distintos para análise de expressão gênica (genes selecionados) .....         | 68  |
| 4.6.4 Expressão gênica de <i>S. mutans</i> .....  | 72  |
| 4.6.4.1 Síntese de cDNA .....   | 72  |
| 4.6.4.2 Quantificação da expressão gênica via qPCR .....  | 73  |
| 4.7 Caracterização Química das Frações de <i>C. sylvestris</i> .....  | 74  |
| 4.8 Análise Estatística.....  | 74  |
| <br>  |     |
| 5 RESULTADO .....   | 75  |
| 5.1 Atividade Antimicrobiana (Cultura Planctônica) dos Extratos Brutos .....  | 75  |
| 5.2 Atividade Antibiofilme (Modelo de Exposição Prolongada - 24h) .....   | 76  |
| 5.3 Efeitos dos Tratamentos Tópicos em Biofilmes Cultivados em Discos sHA (Exposição Breve).....                          | 78  |
| 5.3.1 pH do meio de cultura.....  | 78  |
| 5.3.2 População microbiana, peso seco do biofilme (peso seco insolúvel) e proteínas do biofilme (porção insolúvel) .....  | 79  |
| 5.3.3 Componentes da matriz extracelular dos biofilmes.....   | 80  |
| 5.3.4 Estrutura tridimensional de biofilmes usando microscopia confocal .....   | 82  |
| 5.4 Curva de Inibição do Crescimento de CsF e AcOEt_BRA/DF...82   |     |
| 5.4.1 Estrutura tridimensional de culturas planctônicas usando MEV .....  | 84  |
| 5.4.2 Expressão gênica .....  | 85  |
| 5.5 Perfil Químico das Frações de <i>C. sylvestris</i> .....  | 92  |
| <br>  |     |
| 6 DISCUSSÃO .....   | 94  |
| <br>  |     |
| 7 CONCLUSÃO .....   | 101 |
| <br>  |     |
| REFERÊNCIAS .....   | 102 |
| <br>  |     |
| APÊNDICE A .....  | 121 |
| <br>  |     |
| APÊNDICE B .....  | 133 |
| <br>  |     |
| APÊNDICE C .....  | 134 |
| <br>  |     |
| APÊNDICE D .....  | 139 |
| <br>  |     |
| APÊNDICE E .....  | 141 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>ANEXO A - CERTIFICADO SISGEN.....</b>              | <b>142</b> |
| <b>ANEXO B - CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA .....</b> | <b>146</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as várias doenças bucais, a cárie dentária continua a afetar um grande número de populações em todo o mundo<sup>1</sup>. A cárie dentária trata-se de uma condição crônica multifatorial mediada por biofilme e modulada pela dieta (por exemplo, dieta rica em sacarose)<sup>1-3</sup>. Essa doença multifatorial é determinada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais. Como consequência desse processo, ocorre a perda mineral dos tecidos dentais (esmalte) e desenvolve-se a lesão de cárie. Apesar de inúmeras tentativas de conscientização, a cárie ainda é um preocupante problema de saúde pública com impacto negativo na qualidade de vida de milhões de pessoas<sup>1,2</sup>.

Tem sido amplamente aceito que *Streptococcus mutans* é a principal bactéria associada à etiologia da cárie dentária (embora outros microrganismos possam estar associados)<sup>2,4</sup>. *S. mutans* é acidogênica, acidúrica e a principal produtora de matriz extracelular (MEC) em biofilmes, conhecidos como placa dentária<sup>5</sup>. Isso ocorre porque *S. mutans* codifica múltiplas exoenzimas (e.g., glucosiltransferases ou Gtfs) e na presença de sacarose e amido produz exopolissacarídeos (EPS)<sup>5,6</sup>. As Gtfs são secretadas e são componentes da película salivar e se aderem a outros microrganismos, portanto, fomentam a adesão e o acúmulo de *S. mutans* e outros microrganismos (e.g., *Candida albicans*)<sup>7,8</sup>. A MEC envolve e suporta as células, formando um ambiente altamente coesivo com difusão limitada e nichos ácidos<sup>9,10</sup> que restringem o acesso à saliva tamponada<sup>9,11</sup>. Os EPS são componentes primordiais na montagem da MEC dos biofilmes cariogênicos<sup>5,6</sup> e também são determinantes da virulência<sup>10</sup>. Além disso, o DNA extracelular (eDNA) e os ácidos lipoteicóicos (LTA) são detectados em grandes quantidades em biofilmes cariogênicos<sup>12</sup> e contribuem para sua organização estrutural e propriedades de difusão<sup>13</sup>. Esses fatores de virulência modulam a patogênese da cárie dentária e, assim, são alvos terapêuticos seletivos para prevenção desta doença.

O fluoreto administrado em várias modalidades, continua sendo a base para a prevenção de cárie, no entanto, suas formas de entrega atuais (através da água de abastecimento, por exemplo) são insuficientes para superar o desafio da cárie em muitos indivíduos e portanto, são necessárias abordagens adicionais para aumentar sua eficácia<sup>14</sup>. Agentes químicos (como clorexidina - CHX) são amplamente utilizados para controle do biofilme cariogênico<sup>15</sup>. A CHX suprime os níveis de estreptococos do grupo mutans, no entanto, sua eficácia é reduzida contra biofilmes maduros. Isto

decorre do fato dos EPS na matriz possuir carga negativa e, portanto, influenciam a penetração da CHX (substância catiônica) para dentro do biofilme, afetando a sua propriedade antimicrobiana nesses biofilmes<sup>15</sup>. Além disso, a CHX elimina bactérias bucais que realizam a conversão do nitrato em nitrito, o que parece estar associado à elevação da pressão arterial sistólica<sup>16,17</sup>. O nitrito auxilia a saúde sistêmica através da estimulação do sistema circulatório, assim, a manutenção de uma microbiota oral simbiótica contribui para a saúde geral humana, através da via entero-salivar de nitrato-nitrito-óxido nítrico. Ainda, além da condição supracitada, outro problema decorrente do prolongado uso de CHX é devido aos seus efeitos colaterais, como alteração do paladar, pigmentação de dentes, entre outros<sup>15-17</sup>.

Diante do contexto supracitado, é necessário novas abordagens para o controle e/ou modulação de biofilmes cariogênicos, com maior potencial antimicrobiano e, ao mesmo tempo, não causem toxicidade ao organismo humano. Os produtos naturais são uma abundante fonte de substâncias estruturalmente distintas, com vasta gama de atividades biológicas, que podem ser úteis para o desenvolvimento de terapias anticáries alternativas ou adjuvantes<sup>18</sup>. *C. sylvestris* Sw. (Salicaceae) é uma das espécies mais promissoras do gênero *Casearia* devido às suas propriedades biológicas e usos na medicina popular. Ainda, detém alta capacidade adaptativa e encontra-se extensamente difundida nas Américas Central e do Sul, uma vez que no Brasil ocorre em praticamente todos os biomas<sup>19</sup>. Quimicamente, extratos de folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (Mata-Atlântica) apresentam alta concentração de diterpenos (marcadores taxonômicos para o gênero)<sup>20</sup>; enquanto compostos fenólicos (flavonoides) prevalecem na var. *lingua* (Cerrado)<sup>21,22</sup>. As variações em torno dos esqueletos de estruturas químicas de terpenos e flavonoides de *C. sylvestris* fornece modelos interessantes para estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica desses compostos, que já demonstraram potencial atividade no controle de biofilmes cariogênicos<sup>23</sup>.

As propriedades biológicas de extratos, frações e moléculas de *C. sylvestris* têm sido extensivamente estudadas<sup>23-26</sup> e as atividades antiúlcera, anti-inflamatórias, antiparasitárias e antitumorais reportadas para *C. sylvestris* se atribuem aos diterpenos<sup>19,20,27</sup>. No entanto, poucos estudos foram realizados quanto ao seu potencial antimicrobiano<sup>28-30</sup>, bem como pouco está elucidado quanto à sua atividade biológica contra microrganismos patogênicos encontrados na cavidade bucal<sup>31,32</sup>.

Diante disso, nossos estudos têm se voltado na triagem de extratos brutos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* de diferentes biomas e variedades. A inclusão dessas duas variáveis (bioma e variedade) é vital, pois influenciam na variabilidade da composição química dos metabólitos secundários<sup>22</sup>. Recentemente, demonstramos que extratos brutos e frações de *C. sylvestris* inibem o crescimento de microrganismos associados à patogênese da cárie dentária e os extratos inibem a atividade de GtfB *in vitro*. Este foi o primeiro passo para a identificação de novos inibidores de alvos específicos de crescimento de *S. mutans* presentes em *C. sylvestris*<sup>23</sup>. A prospecção de estudos de extratos vegetais e/ou moléculas isoladas com propriedades antimicrobianas e antibiofilme é uma estratégia relevante para odontologia e outras áreas. Portanto, a investigação de extratos brutos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* é importante para identificar agentes seletivos antibiofilme/antimicrobiano que podem ter aplicações na prevenção de cárie dentária.

## 2 PROPOSIÇÃO

Esse estudo *in vitro* avaliou o efeito de extratos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* (Biomata Mata Atlântica e Cerrado; variedades *sylvestris*, *lingua* e intermediária) para controle de biofilme cariogênico de *S. mutans*.

### 2.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme (biofilmes iniciais e pré-formados) de extratos brutos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* (Bioma Cerrado e Mata Atlântica; variedades *sylvestris*, *lingua* e intermediária);
- b) Avaliar o efeito da exposição tópica de soluções preparadas com frações e moléculas isoladas em biofilmes de *S. mutans* formados sobre discos de hidroxiapatita com película salivar;
- c) Determinar a curva de inibição do crescimento de *S. mutans* para tratamentos selecionados associado às análises de expressão gênica de genes de virulência (relacionados a síntese de exopolissacarídeos insolúveis, à tolerância aos estresses ácido e oxidativo, ao metabolismo de ALT e eDNA e à glicólise) e de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

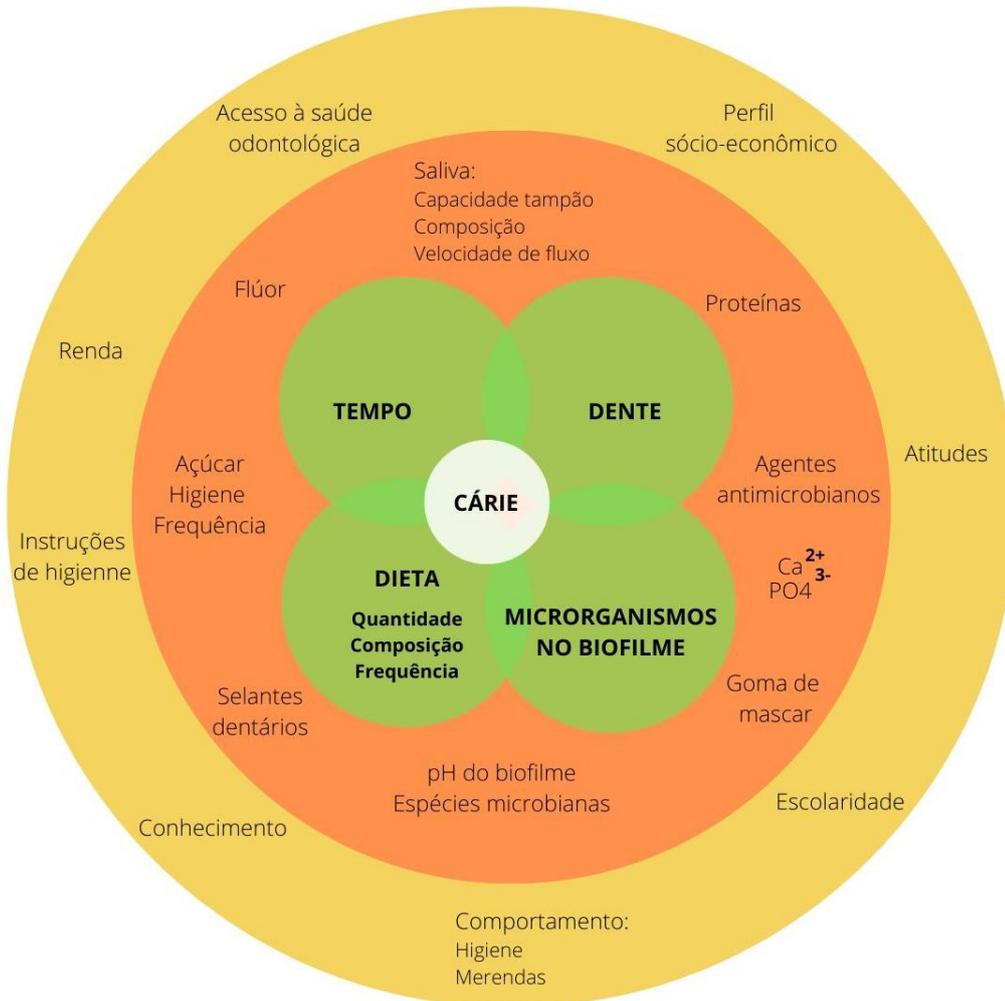
Nesta seção estão descritos os processos biológicos e físico-químicos envolvidos na patogênese da cárie dentária e as principais estratégias disponíveis para o controle da cárie dentária (ou seja, prevenção ou tratamento de biofilmes orais). Também, está resumido o conhecimento sobre os potenciais efeitos biológicos dos produtos naturais no tratamento/prevenção da cárie dentária.

#### 3.1 Cárie Dentária

A saúde bucal é parte integrante e intrínseca da saúde geral e se relaciona aos aspectos biológicos, psíquicos e sociais dos indivíduos, portanto, pode causar grande impacto na qualidade de vida dos mesmos<sup>33</sup>. A cárie dentária é a doença bucal mais prevalente no mundo, sendo um fardo econômico e de saúde pública<sup>1,2</sup>. A cárie ocorre devido ao desenvolvimento de biofilme microbiano nas superfícies dos dentes (placa dentária)<sup>34</sup>. A interação entre os microrganismos que compõe o biofilme, seus produtos e os fatores do hospedeiro fornece condições favoráveis para montagem de uma matriz extracelular rica em EPS, ainda, favorece o acúmulo de espécies acidogênicas e acidúricas que estabelecem o desenvolvimento de biofilmes virulentos-cariogênicos<sup>2</sup>. A permanência deste microambiente ácido na superfície dos dentes resulta na dissolução do esmalte e da dentina em fossas, fissuras e regiões interdentais, eventualmente se espalhando para as superfícies vestibular e lingual da superfície do esmalte, ocasionando a cavitação clínica<sup>2,35</sup>.

Para estabelecer medidas efetivas de controle da doença cárie, é fundamental compreender os seus fatores etiológicos, assim, modelos foram propostos para explicar a multifatorialidade dessa doença. O primeiro modelo foi desenvolvido por Keyes em 1960, o qual era essencialmente ecológico, sugerindo que a cárie seria o produto da interação entre os fatores determinantes: hospedeiro, substrato (dieta cariogênica) e microrganismos (Tríade de Keyes)<sup>36</sup>. Em 1983, Newbrun modificou este modelo incluindo o fator tempo nessa interação, que age simultaneamente com os demais fatores para o desenvolvimento da lesão cariosa<sup>37</sup>. Assim, a Tríade de Keyes modificada por Newburn (Figura 1), foi o modelo mais representativo para explicar a doença cárie<sup>38</sup>.

**Figura 1-** Fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie



Fatores de risco associados ao desenvolvimento da cárie dental. Em amarelo estão fatores pessoais, em alaranjado, fatores ambientais da cavidade bucal e em verde os fatores diretamente implicados na doença.

Fonte: Adaptado de Selwitz et al.<sup>34</sup>, p.54.

A fluoretação da água está entre as políticas públicas para prevenção da cárie, no entanto, não é acessível para todas as populações que vivem em regiões mais afastadas dos centros com distribuição de água potável, além disso, os dentífricos fluoretados só são eficientes quando a escovação dentária é realizada regularmente<sup>35</sup>. Nas últimas décadas poucos foram os avanços para a prevenção, risco de desenvolvimento ou para detecção precoce da cárie<sup>1,39</sup>. Portanto, embora a cárie seja em grande parte uma doença evitável, sua prevalência se manteve constante nos últimos 30 anos e atualmente, é uma adversidade da saúde pública global<sup>40</sup>. O estudo *Global Burden of Disease Study* estima que no mundo 2,5 bilhões de adultos e 573

milhões de crianças experimentaram a cárie, e esta doença além de reduzir a qualidade de vida, gera altos custos para a sociedade<sup>1</sup>. Para exemplificar, em 2010 as doenças dentárias causaram um impacto econômico global de cerca de US \$ 442 bilhões<sup>41</sup>. A propensão é um aumento desses números nos próximos anos em decorrência das mudanças demográficas, crescimento e envelhecimento populacional, somado ao progressivo consumo de açúcares e inapropriada exposição aos fluoretos<sup>1</sup>.

A conduta primária para prevenção da cárie deve se basear nos fatores de risco comuns aos indivíduos e a prevenção e tratamentos secundários, devem se concentrar na condução do processo da doença ao longo do tempo, através de abordagens minimamente invasivas para preservação de tecidos<sup>42</sup>. Em março de 2004, o Ministério da Saúde do Brasil, criou o Brasil Sorridente (política nacional de saúde bucal), que em 2013 investiu R\$ 1 bilhão em recursos dedicados às Equipes de Saúde Bucal e também em investimentos nestes centros<sup>43</sup>. A Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – SB Brasil 2010 demonstrou uma queda de 26% na incidência de cárie na faixa etária de 12 anos entre 2003 e 2010, fazendo com que o Brasil fizesse parte do seleto grupo dos países com baixa prevalência de cárie nessa faixa etária, com um índice melhor que a média dos países das Américas<sup>43</sup>. Em 2020, o Ministério da Saúde acordou uma nova edição do levantamento epidemiológico, o SB – Brasil 2020, que estendeu sua execução, devido a emergência sanitária do coronavírus. Este levantamento proposto pelo Ministério da Saúde (2021-2022) ocorreu durante o ano de 2022 através de parceria com universidades federais e avaliou mais de 50 mil pessoas em diversas regiões do país. Os dados irão auxiliar a qualificar o programa Brasil Sorridente, permitindo a análise das tendências em saúde bucal, o planejamento e avaliação dos serviços de saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>43</sup>.

### **3.2 Biofilme Dental**

A boca hospeda um heterogêneo microbioma de 700 espécies bacterianas e 74 gêneros de fungos, sendo *Candida spp* o principal. Os diversos atributos genotípicos e fenotípicos destes microrganismos possibilitam sua adaptação e sobrevivência às adversidades desse ambiente<sup>44-46</sup>. Este complexo microbioma persevera e cresce nas superfícies orais como biofilmes multiespécies, isto porque os microrganismos em sua forma planctônica (não aderidos a uma superfície) são

transportados para fora da boca e pelo trato digestivo através do fluxo contínuo de secreções do hospedeiro<sup>4</sup>. Assim, para sua sobrevivência in situ, os microrganismos se aderem a uma superfície construindo biofilmes nas superfícies dentárias e nos tecidos epiteliais moles<sup>4</sup>.

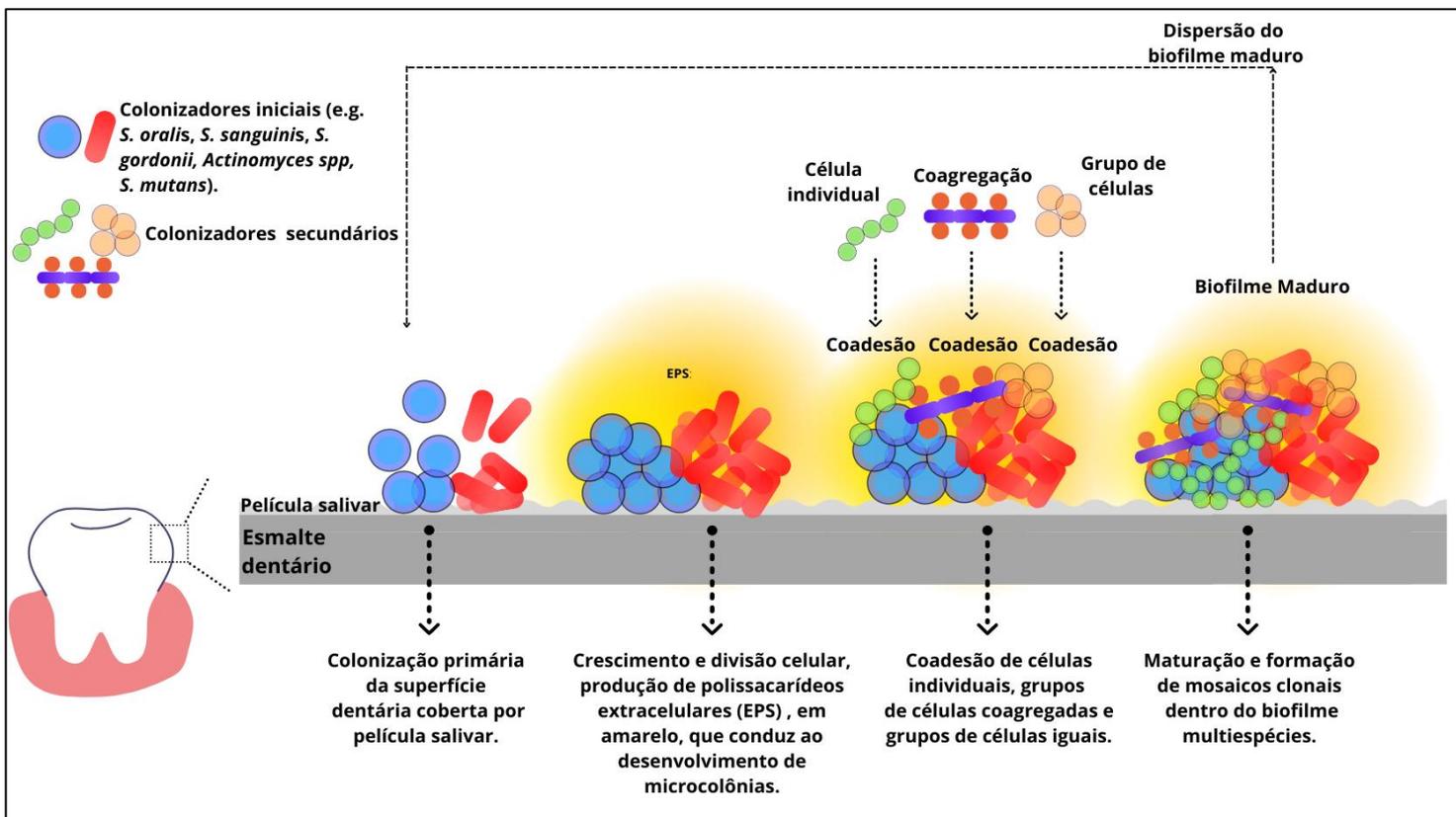
A formação de biofilme é uma das principais causas de desenvolvimento de resistência a vários medicamentos. De forma geral, biofilmes são comunidades de células microbianas bem estruturadas e firmemente aderidas entre si e a superfícies, envoltas por uma matriz tridimensional (3D) de substâncias poliméricas extracelulares, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, esta estrutura 3D é conhecida como matriz extracelular<sup>47</sup>. Os biofilmes cariogênicos se formam em condições dinâmicas de exposição a altas concentrações de carboidratos (“fartura”), seguida por períodos de restrição de nutrientes (“escassez”)<sup>48</sup>. A placa dentária está constantemente exposta a desafios ambientais, o que a torna um dos sistemas de biofilme mais complexos da natureza, e, portanto, é um modelo geral para o estudo da biologia de biofilmes<sup>4</sup>.

Os biofilmes se desenvolvem através de diferentes estágios, sendo eles: fixação inicial de microrganismos na película salivar sobre os dentes, formação de microcolônias, crescimento e produção de exopolissacarídeos e por fim, a formação de um biofilme maduro formado por diversas espécies seguido pela dispersão dos microrganismos para colonizar novos nichos (Figura 2)<sup>49</sup>. Na boca, as superfícies dentárias são revestidas por uma fina película proteica conhecida como película salivar. Esta película é proveniente, de fontes do hospedeiro, principalmente saliva (lisozimas, peroxidases) e de produtos de origem bacteriana (glucosiltransferases, eDNA, LTA, peptideoglicanos). A composição da película salivar é 99% de água e 1% de compostos orgânicos e inorgânicos (lipídios, aminoácidos, minerais, glicoproteínas – mucinas, amilases, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, imunoglobulinas A e G)<sup>50</sup>.

Alguns microrganismos presentes no microbioma oral, têm afinidade para adesão em superfícies, principalmente quando na presença de componentes orgânicos (glicoproteínas), como ocorre com a hidroxiapatita do esmalte dentário<sup>51</sup>. Após formar película salivar, microrganismos colonizadores primários (ou iniciais) em sua forma planctônica (como estreptococos e *Actinomyces spp.*) se fixam à película através de adesão mediada por interações adesina-receptor altamente<sup>51</sup>. Embora em número variável, *S. mutans* pode estar presente entre os microrganismos

colonizadores iniciais (dependendo da dieta do hospedeiro)<sup>52</sup>. Os colonizadores iniciais multiplicam-se no substrato e desenvolvem aglomerados de células microbianas organizadas e estruturadas tridimensionalmente (microcolônias) e passam a sintetizar EPS que compõem a matriz extracelular<sup>51</sup>. Com o substrato recoberto por microrganismos e EPS, inicia-se a coagregação dos colonizadores secundários e maturação do biofilme. Neste estágio, os colonizadores secundários se aderem aos primários ou a outros microrganismos (e à matriz extracelular sintetizada por eles) para se coaderirem aos primários criando uma estruturação entre eles; então o biofilme começa a se transformar em uma comunidade multiespécie<sup>49,51</sup>. Atingida a maturação do biofilme formado, os microrganismos se dispersam para colonizar outras superfícies da cavidade bucal, iniciando a formação de biofilme novamente<sup>49</sup>.

**Figura 2-** Etapas do desenvolvimento de biofilmes orais



Célula individual designa cadeia de células da mesma espécie

Fonte: Adaptado de Rickard et al.<sup>49</sup>, p.95.

### 3.3 A Matriz Extracelular do Biofilme e Seus Constituintes

A matriz é o material extracelular sintetizado pelos próprios microrganismos, no qual as células do biofilme estão inseridas. Além dos polímeros sintetizados no

exterior das células, alguns são sintetizados dentro das células e então secretados<sup>11</sup>. A matriz extracelular trata-se de um conglomerado de EPS que formam o arcabouço para a arquitetura 3D do biofilme e é responsável pela adesão às superfícies e pela coesão do biofilme<sup>11</sup>. As qualidades estruturais e bioquímicas da matriz são essenciais para manutenção da vida do biofilme e expressão de virulência dos patógenos. Dentro do biofilme, a matriz extracelular rica em EPS impulsiona a formação de nichos ácidos, que são regiões com baixos valores de pH (no intervalo de 4,5 - 5,5); dentro do biofilme, muitas das quais estão localizadas nas proximidades da superfície de apatita. Este microambiente ácido favorece a seleção de patógenos acidogênicos, acidúricos e de ligação a glucanos (produzido pelas Gtfs), como por exemplo, *S. mutans*. Assim, criam-se locais de desmineralização na superfície de fixação do biofilme, mudando de uma fase não virulenta para uma virulenta<sup>9</sup>.

A matriz extracelular é constituída por diversas substâncias poliméricas extracelulares hidratadas, que são influenciadas e moduladas por fatores ambientais locais. Além de EPS, estão presentes nas matrizes constituintes salivares e bacterianos, como proteínas, lipídios, lipopolissacarídeos, ácidos lipoitecócicos (LTA) extracelulares e DNA extracelular (eDNA)<sup>10,12</sup>. Todos estes componentes da matriz extracelular podem atuar como fatores de virulência e modular a patogênese da cárie dentária, portanto, são alvos terapêuticos seletivos para prevenção de biofilmes cariogênicos<sup>13,53,54</sup>. A produção de EPS impacta expressivamente a virulência de biofilmes cariogênicos<sup>10,55</sup>. A sacarose e amido (procedentes da dieta) são essenciais para o desenvolvimento do biofilme cariogênico. A sacarose serve de substratos para a síntese de EPS na superfície da película salivar e o amido é acceptor de elétrons, influenciando nos tipos de ligações glicosídicas durante a síntese com o substrato sacarose e também na ramificação dos glucanos formados<sup>5</sup>. Além disso, a sacarose pode ser fermentada para produzir ácidos dentro do biofilme, criando os nichos ácidos<sup>5</sup>. Após a exposição à estes dois carboidratos, as exoenzimas de *S. mutans*, glucosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs), sintetizam EPS com estrutura e composição variadas a depender do intervalo desde a última ingestão de açúcares na dieta<sup>5</sup>. Embora em menor quantidade, frutanos podem estar presentes na matriz, que são polímeros de frutose produzidos pela enzima Ftf<sup>5</sup>.

Os EPS oferecem sítios de ligação na superfície via diversas proteínas de ligação (como adesinas), assim contribuem para colonização e acúmulo de *S. mutans* e de outros microrganismos na superfície<sup>56</sup>. Os EPS são componentes-chave para

construção da matriz 3D que circunda e apoia as células do biofilme, criando um ambiente coeso, de difusão limitada e com nichos acídios<sup>10</sup>. A acidificação da matriz rica em EPS insolúveis favorece o desenvolvimento de microrganismos acidúricos e somado à redução de pH na interface dente-biofilme, ocorre a desmineralização do esmalte dentário, levando ao início clínico da cavitação<sup>5</sup>.

*S. mutans* também pode liberar eDNA e LTA, que demonstram importância estrutural para o estabelecimento e integridade da matriz extracelular em biofilmes de *S. mutans*<sup>12,13,57</sup>. *S. mutans* pode produzir e liberar eDNA durante a lise celular (autólise) e/ou via microvesículas presentes na membrana<sup>57</sup>. As condições ambientais e desenvolvimento do biofilme modulam a presença e quantidade de eDNA no biofilme, assim, eDNA desempenha um papel substancial na adesão bacteriana e iniciação do biofilme de *S. mutans*<sup>57,58</sup>. LTA é um polímero da parede celular de bactérias Gram-positivas, que consiste em 1,3-poliglicerol-fosfato ancorado à membrana celular por uma lipoproteína<sup>59</sup>. Principalmente durante a remodelação da parede celular ou divisão celular, o LTA pode ser liberado no ambiente extracelular<sup>59</sup>. O LTA exerce importante função na colonização de bactérias Gram-positivas, contribui para a formação e patogenicidade de biofilmes, e está associado à adesão e colonização de estreptococos orais<sup>60</sup>.

eDNA e LTA operam de modo importante em conjunto com EPS na montagem da matriz extracelular<sup>13</sup>. A formação de nichos altamente acídicos dentro da matriz de biofilmes cariogênicos<sup>9</sup> torna este microambiente ácido e induz a expressão de *gtfB*<sup>53,61</sup>, sistema de dois componentes *lytST* (associado à lise celular e remodelação da parede celular)<sup>53,61</sup> e operon *dltABCD* (relacionado ao metabolismo do LTA)<sup>53</sup>. O aumento da expressão destes genes culmina no acúmulo de EPS, eDNA e LTA que permitem a construção de uma matriz extracelular volumosa e robusta em biofilmes de *S. mutans*<sup>13,61</sup>. Ressalta-se que o eDNA coopera com EPS nas fases iniciais, enquanto o LTA desempenha um papel mais importante nas fases posteriores do desenvolvimento do biofilme. Ainda, eDNA e o LTA influenciam a distribuição de EPS e a organização das microcolônias. Quando presentes em grande quantidade, LTA e eDNA podem influenciar as interações eletrostáticas e as propriedades de difusão da matriz devido à carga negativa que apresentam<sup>62</sup>. Assim, o eDNA e o LTA podem moldar a estrutura dos EPS, afetando as estratégias de controle de biofilmes patogênicos<sup>13</sup>.

### 3.4 *Streptococcus mutans*

Vários microrganismos contribuem para início e progressão da cárie dentária, no entanto, é concebível que *S. mutans* exerce função primordial na patogênese da cárie<sup>4,2</sup>. *S. mutans* são cocos Gram-positivos e anaeróbios facultativos e sua relevância na etiologia e patogênese da cárie dentária está em sua capacidade de montar uma matriz polimérica 3D insolúvel e não simplesmente na superioridade numérica ou acidogenicidade<sup>5,63</sup>. Outros microrganismos presentes no biofilme dentário são igualmente e/ou excelentes produtores de ácido e acidúricos, incluindo outros estreptococos (*Streptococcus vestibulares*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium dentium*, *Candida* spp e *Scardovia* spp)<sup>52,63,64</sup>. Para garantir a colonização e persistência, *S. mutans* se adere à superfície dentária através (i) da expressão de proteínas de superfície (adesinas) e (ii) da presença de carboidratos usados para formação da matriz extracelular. A adesão pela via independente de sacarose ocorre pela expressão de adesinas (i.e., SpaP, Wap, AgI/II) que reconhecem e se ligam à receptores específicos (glicoproteína-340 ou gp-340) na película salivar<sup>65,66</sup>. A via dependente de sacarose é mediada por ligação de glucanos (através das proteínas ligantes de glucano ou Gbps, do inglês *glucans binding proteins*) e está diretamente relacionada à cariogenicidade do biofilme porque é guiada pelas enzimas Gtfs que sintetizam EPS<sup>67</sup>.

*S. mutans* produz e secreta pelo menos 3 Gtfs geneticamente distintas (GtfB, GtfC e GtfD), as quais sintetizam glucanos estruturalmente distintos a partir de sacarose e hidrolisados de amido derivados da dieta do hospedeiro<sup>68</sup>. A população de *S. mutans* na microbiota total é irrelevante diante de sua extraordinária capacidade de produzir três enzimas estruturalmente diferentes e que atuam no mesmo substrato, influenciando diretamente na formação e composição do biofilme<sup>5</sup>. GtfB (formalmente conhecida como Gtfl) sintetiza glucanos principalmente insolúveis em água ricos em ligações  $\alpha$ -1,3<sup>7,69</sup>. Além disso, em conjunto com  $\alpha$ -amilase, GtfB se adsorve na superfície dentária como parte da película salivar e fomenta o aumento da síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água, que por sua vez, fornecem locais de ligação nas superfícies apatíticas para aumento de aderência microbiana<sup>70</sup>. GtfC (formalmente GtfSI) sintetiza tanto glucanos solúveis como insolúveis, no entanto, a proporção de glucanos solúveis e insolúveis depende se está adsorvida ou não à uma superfície. GtfC tem preferência por superfícies e por isso faz com que produza mais glucanos insolúveis<sup>70</sup>. A presença de domínios hidrofóbicos em GtfC permite a

interação dessa enzima com macromoléculas salivares presentes na película (como peroxidase, lisozima e  $\alpha$ -amilase). Por isso, GtfC se encontra principalmente como parte da película salivar adquirida<sup>70</sup>. Na película salivar também é encontrada GtfD (formalmente GtfS), embora em menor quantidade. Esta enzima produz glucanos predominantemente solúveis em água, facilmente metabolizáveis e que atuam como iniciadores para GtfB<sup>69,70</sup>.

As Gtfs secretadas por *S. mutans* também se ligam à superfície de outras bactérias orais (mesmo em bactérias que não sintetizam as Gtfs)<sup>71</sup> convertendo-as em produtores de glucanos<sup>70</sup>. Na presença de sacarose, as Gtfs estão ativamente produzindo EPS e podem adsorvem-se às células do fungo *C. albicans*, por exemplo, convertendo-as em de fato produtores de glucanos<sup>8</sup>. O resultado da associação de *S. mutans* e *Candida albicans* é uma maior complexidade funcional e organização 3D de biofilmes mistos devido a produção de EPS por ambas espécies, mas principalmente por *S. mutans*<sup>72</sup>. Ainda, quando presente em biofilmes mistos, *C. albicans* induz a expressão de genes *gtfs* de *S. mutans* e pode elevar o acúmulo de *S. mutans* na superfície do esmalte dentário, modulando assim o desenvolvimento de biofilme<sup>8</sup>.

O acesso a nutrientes adequados é um fator determinante para sobrevivência bacteriana no biofilme. Na cavidade oral, as bactérias devem lidar com longos períodos em que a saliva é o nutriente primário e com momentos em que os nutrientes da dieta são abundantes. Apesar da crucial capacidade de sobreviver a longos períodos de privação de carboidratos, a exposição repentina a uma quantidade excessiva de açúcar também é um grande desafio para as bactérias orais<sup>73,74</sup>. A rápida entrada e degradação de açúcares nas células pode resultar em um acúmulo de níveis tóxicos de intermediários glicolíticos, resultando em morte celular. Para sobreviver a tais condições, os estreptococos orais desenvolveram sofisticados mecanismos fisiológicos e genéticos para regular o metabolismo do açúcar de acordo com a fonte e disponibilidade<sup>73,74</sup>. *S. mutans* depende exclusivamente da glicólise para produção de energia, ainda, esse micorganismo apresenta capacidade de metabolizar uma grande variedade de carboidratos<sup>73,74</sup>.

O transporte de açúcares ocorre através de transportadores de membrana dependentes de ATP e pelos sistemas fosfoenolpiruvato (PEP) açúcar: fosfotransferase (PTS). Em bactérias gram-positivas, como *S. mutans*, os PTSs são os principais transportadores de carboidratos, na sua maioria monossacarídeos, dissacarídeos,  $\beta$ -glicosídeos e álcoois de açúcar<sup>75</sup>. Os PTSs regulam os processos

metabólicos e transcricionais e ainda são responsáveis por formar ligações, transporte de transmembrana e fosforilação de inúmeros substratos de açúcar, além de regular processos metabólicos e transcricionais<sup>75</sup>. O gene *eno* codifica a enolase bacteriana, que catalisa a formação de fosfoenolpiruvato, componente chave do sistema PEP: carboidrato fosfotransferase (PTS) que contribui para a absorção de açúcar bacteriano<sup>74,76,77</sup>. É estabelecido que a inibição da enolase pelo flúor contribui para a ação antimicrobiana do flúor<sup>78,79</sup>, no entanto, esta enzima foi proposta como sendo insensível ao flúor em cepas resistentes à agente químico<sup>80</sup>. Uma mutação foi identificada no gene da enolase, que provavelmente resultou em uma redução da sensibilidade da enolase ao flúor, o que permite que as bactérias metabolizem açúcares mesmo diante de altas concentrações de flúor<sup>81</sup>.

*S. mutans* realiza rápida fermentação de carboidratos o que gera produtos finais ácidos (acidogenicidade), a consequência não é apenas a desmineralização das superfícies dentárias, mas é também determinante ambiental que impacta a flora microbiana relacionada à cárie durante o processo cariogênico<sup>77</sup>. A exposição ácida e o estresse oxidativo são dois dos principais estresses ambientais aos quais microrganismos devem se adaptar na cavidade oral. Para sobreviver no ambiente ácido que produz (aciduricidade), *S. mutans* desenvolveu respostas adaptativas de tolerância ácida através da indução de múltiplas vias celulares<sup>82</sup>, sendo que uma das principais defesas contra desafios ambientais, como o choque ácido, é a própria membrana bacteriana<sup>83</sup>. Para manutenção da homeostase do pH intracelular, *S. mutans* altera a composição da membrana através do aumento de ácidos graxos mono-insaturados de cadeia longa e redução de ácidos graxos saturados de cadeia curta. Esta alteração reduz a permeabilidade de prótons da membrana celular e ativação do sistema F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase de translocação de prótons<sup>83,84</sup>.

O sistema F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, uma ATPase de translocação de prótons ligado à membrana, é importante para a sobrevivência de espécies de *Streptococcus* orais em ambientes ácidos porque mantém o pH citoplasmático mais alcalino que o pH do ambiente; confere proteção a enzimas glicolíticas sensíveis a ácidos e mantém o ΔpH para processos bioenergéticos<sup>73</sup>. Em *S. mutans*, o sistema F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase é codificado por 6 genes (*atpC*, *atpD*, *atpG*, *atpA*, *atpH*, *atpF*), dentre os quais *atpD* é o que apresenta maior expressão e síntese, tem função crítica na montagem do sistema ATPase e é altamente induzida em pH baixo, e é considerado o principal determinante da tolerância ácida em *S. mutans*<sup>85,86</sup>. Além do estresse ácido, *S. mutans* lida com a

exposição ao estresse oxidativo, criado pelo oxigênio presente na cavidade oral, bem como níveis bactericidas de  $H_2O_2$  produzidas pelos colonizadores primários da placa dentária (por exemplo, *Streptococcus sanguinis* e *S. gordonii*) na tentativa de impedir a persistência e proliferação de *S. mutans* e outros microorganismos cariogênicos<sup>87,88</sup>. Para sobreviver a esse ataque e se estabelecer no ambiente, *S. mutans* deve ser capaz de prevenir a formação e eliminar as espécies reativas de oxigênios prejudiciais. Para isso, *S. mutans* codifica enzimas importantes na eliminação de espécies reativas de oxigênio potencialmente perigosas<sup>89</sup>. O gene *nox1* (SMU.1117) codifica a NAD à base de flavina (NADH) oxidase (Nox), que atua para reduzir o oxigênio, um elétron de cada vez, a  $H_2O$ , através da oxidação de NADH a  $NAD^{+90,91}$ . As contribuições da enzima Nox para as respostas ao estresse ácido e de oxigênio, bem como o metabolismo, são extremamente importantes para *S. mutans*, um organismo que carece de catalase, citocromo oxidases e sistema de transporte de elétrons<sup>92</sup>.

Nox apresenta atividade elevada tanto em condições de estresse oxidativo e baixo pH, esta enzima é a principal enzima metabolizadora de oxigênio utilizada por *S. mutans*<sup>90</sup>. A mutação de *nox1* na cepa do tipo genômico *S. mutans* UA159, demonstrou que a NADH oxidase desempenha um papel na resposta ao estresse ácido, pois a inativação de *nox1* provoca mudanças na composição de ácidos graxos da membrana e na produção metabólica que lembram as observadas durante a exposição a baixo pH<sup>90,93,94</sup>. Além de reduzir o oxigênio, *nox1* também é fundamental na regeneração do  $NAD^{+}$ , uma molécula chave na produção de piruvato durante o metabolismo do carbono em estreptococos<sup>95</sup>.

O controle rígido da autólise por *S. mutans* é fundamental para a expressão gênica de virulência adequada e formação de biofilme. A autólise altera a composição da parede celular, que é uma estrutura dinâmica e complexa que se expande (quando as células crescem) e é remodelada durante a divisão celular<sup>96</sup>. *S. mutans* possui dois operons, SMU.575/574 (*IrgAB*) e SMU.1701/1700 (designado *cidAB*), que são homólogos aos operons *cidAB* e *IrgAB* que foram extensivamente estudados em organismos como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*<sup>97,98</sup>. A homologia de sequência indica que *cidAB* e *IrgAB* codificam proteínas de membrana que são semelhantes às proteínas de membrana *holina-antiholina* da família do bacteriófago lambda<sup>98,99</sup>. Essas proteínas controlam a autólise e a morte celular modulando a permeabilidade da parede celular bacteriana<sup>99</sup>. Posteriormente, demonstrou-se que o sistema *LrgAB* também desempenha um papel significativo na modulação de uma

variedade de características-chave de virulência de *S. mutans*, incluindo autólise, formação de biofilme, estresse oxidativo e térmico e competência genética<sup>99-102</sup>. Uma mutação *IrgAB* também afeta as principais vias metabólicas associadas a carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos/lipídios, metabolismo e transporte de nucleotídeos<sup>101,102</sup>. A ativação de *IrgA* na fase estacionária do crescimento planctônico ocorre de forma e sincronizada em toda a população de *S. mutans*. Essa ativação é controlada por um pequeno número de condições sensíveis à fase de crescimento: piruvato extracelular, glicose e oxigênio molecular. A ativação de *IrgA* parece ser autolimitada, de modo que a auto da expressão de *IrgA* se limita a um curto intervalo de tempo. Este gene é programado para se ativar brevemente no final do crescimento exponencial de *S. mutans*, à medida que ocorre esgotamento de glicose e o oxigênio e que há disponibilidade de piruvato extracelular<sup>103</sup>.

Os estudos clínicos destacam a importância de *S. mutans* na capacidade de promover cárie dentária, entretanto, o papel da espécie na cariogênese não é totalmente dependente dos níveis bacterianos, uma vez que os fatores de virulência expressos por esta espécie alteram a estrutura do biofilme e promovem mudanças ecológicas levando à transição de um biofilme não virulento para um altamente virulento<sup>15</sup>. Portanto, para controlar a cárie é necessário a combinação de diferentes abordagens preventivas e terapêuticas com alvos específicos.

### **3.5 Estratégias para Controle do Biofilme Cariogênico**

Uma vez que a formação do biofilme contribui para a patogenicidade dos microrganismos que o compõe e desenvolvimento de carie dentária, estratégias são necessárias para lidar com esse problema. A interrupção mecânica diária autoadministrada e a remoção do biofilme cariogênico são amplamente indicados e fundamentais para a saúde bucal<sup>104</sup>. O método mecânico mais difundido para controle do biofilme cariogênico ocorre através da correta higienização com escovas dentais (recomendado aos menos 3 vezes ao dia) associada ao uso de dentifrícios contendo compostos como detergentes, abrasivos e antimicrobianos, que alcançam seus efeitos em conjunto com a escovação mecânica dos dentes<sup>105,106</sup>. A otimização do controle do biofilme cariogênico não pode ser alcançado apenas com a escovação, pois devido ao seu formato, as escovas dentais não penetram em áreas interdentais e, portanto, há necessidade de auxiliares de limpeza interdentais adjuvantes, como fio dental ou escovas interdentais. A escolha do auxiliar de limpeza interdental dependerá

do tamanho do espaço e da habilidade do paciente em utilizá-lo<sup>104</sup>. O uso diário do fio dental (recomendado uma vez ao dia) promove o controle mecânico do biofilme nas superfícies interproximais, no entanto, a adesão do paciente ao uso diário do fio dental é baixa<sup>107</sup> devido à baixa motivação e às dificuldades no uso do fio dental<sup>108</sup>.

Associado aos meios mecânicos, o uso do flúor é uma das medidas de maior sucesso na história da saúde pública e é reconhecido como o componente central nas estratégias de prevenção da cárie dentária<sup>109</sup>. O uso do flúor promoveu reduções dramáticas na cárie dentária em crianças onde foi disponibilizado por meio de fontes como água fluoretada, sal e dentifrícios, enxaguantes tópicos, géis e suplementos dietéticos<sup>109</sup>. O fluoreto tem um efeito importante na desmineralização e remineralização do tecido dentário. A fonte desse flúor pode ser a fluorapatita (formada pela incorporação do flúor ao esmalte) ou precipitados semelhantes ao fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ), que se formam no esmalte e no biofilme após a aplicação tópica de flúor. Os depósitos de  $\text{CaF}_2$  são protegidos da rápida dissolução por um revestimento fosfato-proteína de origem salivar. Em pH mais baixo, o revestimento é perdido e ocorre um aumento na taxa de dissolução do  $\text{CaF}_2$ . Portanto, o  $\text{CaF}_2$  atua como uma fonte eficiente de íons flúor livres durante o desafio cariogênico. As evidências atuais indicam que o flúor tem um efeito direto e indireto nas células bacterianas, embora as implicações *in vivo* disso ainda não estejam claras<sup>110</sup>. Os benefícios sistêmicos do flúor são mínimos, o nível de flúor incorporado ao mineral dental por ingestão sistêmica é insuficiente para desempenhar um papel significativo na prevenção da cárie. Além disso, o uso de “suplementos de flúor” deve ser empregado como um sistema de entrega “tópico” através de mastigação ou pastilhas, permitindo o máximo tempo de contato antes de engolir<sup>111</sup>. No entanto, o flúor em suas formas de entrega atual é insuficiente para superar o desafio da cárie em muitos indivíduos. A distribuição melhorada e mais eficaz de flúor nas quantidades certas e por períodos prolongados é possível e necessária<sup>111</sup>.

Em combinação com os meios mecânicos e com a fluoroterapia, os agentes químicos como clorexidina, triclosan e óleos essenciais (líquido hidrófobo que contém compostos químicos voláteis obtidos a partir de plantas) são amplamente utilizados para controle do biofilme cariogênico<sup>112</sup>. A prática de bochechos com agentes químicos é usada por humanos há mais de 2.000 anos. Na década de 1880, Willoughby D. Miller (um dentista com formação em microbiologia) sugeriu o uso de um enxaguante bucal antimicrobiano contendo compostos fenólicos para combater a

inflamação gengival<sup>113</sup>. Nas últimas décadas, o uso de enxaguantes bucais tornou-se habitual e geralmente é recomendado após o controle mecânico do biofilme<sup>112</sup>. O digluconato de clorexidina é uma bisbiguanida catiônica com um amplo espectro de atividade antibacteriana<sup>114,115</sup>. Em altas concentrações, as propriedades antimicrobianas da clorexidina (CHX) são direcionadas principalmente à ruptura da membrana celular bacteriana, aumentando a permeabilidade e resultando em lise celular. Em baixas concentrações, a CHX é bacteriostática, pois promove alteração da integridade da membrana celular<sup>116</sup>. As intervenções baseadas na aplicação de CHX se mostram eficazes na supressão dos níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva e por isso foram consideradas uma estratégia para a prevenção da cárie dentária<sup>114,115</sup>. Enxaguantes bucais contendo CHX têm sido usados por muitos anos<sup>117</sup> e são considerados padrão-ouro na prática odontológica<sup>114</sup>. Estão disponíveis para venda inúmeras preparações e formulações a base de CHX em diferentes concentrações, como cremes dentais (0,4%); enxaguantes bucais em formulações à base de álcool (etanol) ou não alcoólicas (0,12% e 0,2%); géis (1%); vernizes contendo timol (1%, 10%, 20% e 35%); gomas de mascar; e sprays (0,2%). As preparações podem ser administradas por um profissional de saúde odontológica (por exemplo, vernizes) ou através da autoaplicação (com ou sem supervisão) na forma de enxaguantes bucais, géis e dentifrícios<sup>118</sup>.

Embora a CHX seja capaz de suprimir os níveis de estreptococos do grupo mutans, sua eficácia é reduzida contra biofilmes maduros. Isto ocorre porque os EPS da matriz possuem carga negativa e, portanto, afetam a penetração da CHX (substância catiônica) para dentro do biofilme, comprometendo a sua atividade antimicrobiana nesses biofilmes<sup>15,119</sup>. Além disso, a CHX é capaz de eliminar bactérias bucais que convertem nitrato em nitrito. O nitrato é absorvido no trato gastrointestinal, reoxidado a óxido nítrico e nitrato no sangue e secretado na saliva, processo este conhecido como circulação entero-salivar de nitrato<sup>16</sup>. Portanto, o uso da CHX por um período contínuo e prolongado parece estar associado à elevação da pressão arterial sistólica<sup>16,17</sup>. Ainda, a CHX apresenta efeitos colaterais a nível bucal conhecidos, sendo os mais comuns as manchas temporárias dos dentes e descoloração da língua, dor e descamação da mucosa, gosto amargo e distúrbios temporários do paladar, formação de cálculos. Também há relatos crescentes de hipersensibilidade imediata à CHX, que pode resultar em anafilaxia com risco de vida<sup>120,121</sup>. Além disso, a CHX tem efeitos citotóxicos em uma ampla variedade de células humanas, incluindo células

da mucosa oral, células sanguíneas, queratinócitos, osteoblastos e osteoclastos<sup>122,123</sup>. Embora enxaguantes bucais tenham seu papel na manutenção da saúde bucal, sua utilidade pode ser questionável e limitada quando se trata de uso diário pela população em geral.

Levando em consideração os mecanismos que envolvem o início e progressão da cárie, a exposição oral prolongada aos carboidratos fermentáveis é um dos fatores de risco dietético mais relevante para a atividade da doença, principalmente entre crianças e adolescentes<sup>1,2,34</sup>. Um alarmante dado é a associação entre a obesidade infantil e a cárie dentária, ambas são condições multifatoriais e estão associadas a efeitos negativos sobre a saúde ao longo da vida dos indivíduos, ainda impõem uma carga considerável aos sistemas nacionais de saúde<sup>1,2,34</sup>. Portanto, a intervenção dietética é considerada uma das estratégias de prevenção da cárie dentária e tem como objetivo reduzir ou eliminar a ingestão de carboidratos fermentáveis (principalmente sacarose)<sup>124,125</sup>. Diante deste alarmante problema de saúde pública, os cirurgiões-dentistas devem adotar práticas clínicas sistemáticas para identificar e tratar o excesso de ingestão de açúcar dos pacientes, no entanto, há uma carência de estratégias clínicas baseadas em evidências<sup>126</sup>. Além disso, para correto manejo dietético visando a redução da doença cárie, são necessárias pesquisas adicionais de intervenção sociocomportamental, programas de saúde pública voltados para indivíduos de maior risco e mudanças nas políticas de saúde<sup>124</sup>. Outras intervenções dietéticas para prevenir a cárie incluem substitutos do açúcar (como xilitol), a recomendação de alimentos funcionais e uso de probióticos<sup>127-129</sup>. Bem como faz-se necessário a busca por novas modalidade terapêuticas (como novos compostos antimicrobianos de origem natural) que possam ser aplicadas em conjunto com o condicionamento dietético dos pacientes.

Recentemente, foi demonstrado que prebióticos e probióticos podem potencialmente ser desenvolvidos em novos simbióticos contra patógenos orais para o futuro manejo da cárie dentária<sup>130,131</sup>. Um prebiótico é um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo assim um benefício à saúde através do estímulo do crescimento de bactérias benéficas e supressão do crescimento de patógenos<sup>131</sup>. A arginina tem sido utilizada como prebiótico oral para potencializar o crescimento de bactérias alcalogênicas promotoras da saúde oral, como *S. sanguinis*, com posterior inibição da bactéria cariogênica *S. mutans*<sup>132</sup>. Além disso, potencializa os efeitos antimicrobianos e de remineralização do flúor<sup>131</sup>. No

entanto, o uso prolongado de arginina pode facilitar a alcalinização da placa, promovendo o supercrescimento de microrganismos anaeróbios orais, como *Porphyromonas gingivalis*<sup>132</sup>.

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. Fornece um efeito protetor local ao neutralizar as atividades dos patógenos e um efeito indireto sistêmico na melhora imunológica<sup>31,133</sup>. *Lactobacillus rhamnosus* GG é o probiótico mais pesquisado com profundos benefícios para a saúde sistêmica e efeitos antagônicos em bactérias cariogênicas; entretanto, seu efeito no meio bucal é breve<sup>133,134</sup>. Portanto, para otimizar o uso de probióticos com benefícios à saúde, é necessário um adjuvante que promova a colonização dos probióticos e que ao mesmo tempo module os fatores de virulência do patógeno. Com base nessa premissa, o uso de simbióticos pode representar uma nova estratégia preventiva de cárie visando promover o crescimento de bactérias arginolíticas saudáveis (por exemplo, *S. sanguinis*) por prebióticos e simultaneamente enriquecer o crescimento de probióticos (por exemplo, *L. rhamnosus* GG) para duradoura colonização oral<sup>131,133</sup>. No Quadro 1 encontram-se os mecanismos pelas quais as estratégias preventivas de cárie contribuem para manter ou restaurar um microbioma equilibrado.

**Quadro 1-** Mecanismos pelas quais as estratégias preventivas de cárie contribuem para manter ou restaurar um microbioma equilibrado

| Medida   | Mecanismo de ação  | Efeito no pH/composição do biofilme   | Referência   |
|--|--|---|--|
| <b>Escovação diária dos dentes</b>               | Disrupção do biofilme, restringe o acúmulo de biofilme   | Controle do crescimento e as comunidades clímax   | Worthington et al. <sup>104</sup>  |
| <b>Fluoreto</b>                                  | Diminui a atividade metabólica in vitro no biofilme por inibir a enzima enolase (via glicolítica); efeito na desmineralização e remineralização do tecido dentário | Menor produção de ácido/inibição do metabolismo bacteriano; o CaF <sub>2</sub> , atua como uma fonte eficiente de íons flúor livres durante o desafio cariogênico | Ten Cate <sup>79</sup> ; Rošin-Grget et al. <sup>110</sup> ; Hamilton <sup>135</sup> |
| <b>Clorexidina</b>                               | Afeta a membrana celular   | Suprimir os níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva   | Mattos Graner et al. <sup>15</sup>   |
| <b>Redução de açúcar (quantidade/frequência)</b> | Reduz o substrato disponível para produção de ácido e matriz do biofilme   | Bactérias acidúricas menos favorecidas  | Keller et al. <sup>136</sup>   |
| <b>Prebióticos e probióticos</b>                 | Favorece o crescimento de bactérias orais benéficas  | Restringe o crescimento de espécies associadas à cárie; menor produção de ácido   | Bijle et al. <sup>131</sup>  |

Fonte: Elaboração própria.

As recomendações para as práticas de higiene oral têm se concentrado em métodos mecânicos (escovação e limpeza interdental) e aplicação de flúor (em diferentes modalidades) e uso de enxaguantes bucais. No entanto, as modalidades terapêuticas disponíveis para o controle/modulação da formação de biofilme dental apresentam suas limitações. A relevância dos biofilmes nas doenças infecciosas orais e na disseminação da resistência a vários medicamentos implica na urgente busca por novos agentes que possam regular a formação e o desenvolvimento do biofilme<sup>18,137</sup>. Melhores agentes terapêuticos e melhores sistemas de administração são necessários e seriam um grande avanço, especialmente para indivíduos com alto desafio cariogênico<sup>18,137</sup>.

### 3.6 Produtos Naturais

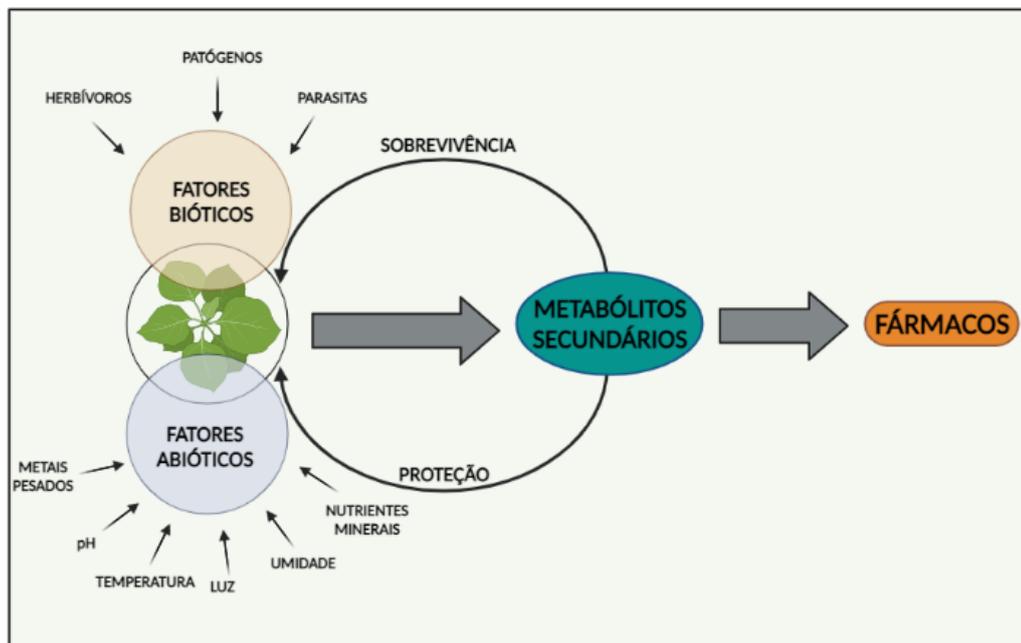
Os produtos naturais desempenham um papel crítico na medicina contemporânea devido à capacidade de se ligar e modular alvos celulares relacionados a diversas doenças. A identificação de alvos farmacológicos a partir de ativos de plantas medicinais tornou-se interesse de pesquisas biomédicas visando gerar terapias inovadoras<sup>138</sup>. Além da ampla diversidade química presente nos produtos naturais, os menores efeitos adversos somados a acessibilidade destacam seu potencial em relação aos remédios tradicionais/sintéticos<sup>138</sup>.

Antigas civilizações recorreram aos produtos naturais para prevenir e tratar um amplo espectro de enfermidades e, esses sistemas baseados em plantas continuam a exercer importante papel nos cuidados de saúde em países industrializados e em desenvolvimento como complemento às terapias modernas<sup>139,140</sup>. Os primeiros registros do uso de produtos naturais foram escritos em tábuas de argila na Mesopotâmia e datam de cerca de 2600 a.C.; entre as substâncias descritas estavam óleos de *Cedrus species* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Commiphora myrrha* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), todos ainda em uso hoje para o tratamento de doenças que variam de tosses e resfriados a infecções parasitárias e inflamações<sup>141</sup>. O Papiro Ebers é um registro farmacêutico egípcio considerado um dos tratados médicos mais antigos e importantes. Este registro é de 1500 a.C. e documenta cerca de 700 fármacos (principalmente de origem vegetal) e inclui fórmulas como gargarejos, infusões, pílulas e pomadas, com cerveja, leite, vinho e abelha<sup>141</sup>

Um exemplo notável da riqueza dos recursos disponíveis é o Repositório de Produtos Naturais do Instituto Nacional do Câncer (NCI Natural Products Repository, localizado no Frederick National Laboratory for Cancer Research), que compreende entre > 180.000 extratos de > 50.000 organismos<sup>142</sup>. Outras organizações mantêm bibliotecas semelhantes e focadas em extratos brutos e frações de origens naturais, incluindo o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, com um banco de extratos de plantas brasileiros<sup>143</sup>. O NuBBE é o resultado do trabalho colaborativo entre pesquisadores do Instituto de Química da UNESP de Araraquara/SP, peritos na área de produtos naturais e além do banco de dados, realiza a prestação de serviços relativos ao desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para análise de produtos vegetais (extratos e frações), identificação de marcadores fitoquímicos e preparação e caracterização de padrões fitoquímicos. O NuBBE desenvolve estudos fitoquímicos como isolamento e identificação de uma série de metabólitos secundários de relevância biológica nas plantas que ocorrem nos biomas Cerrado e Mata Atlântica no Brasil. Entre os compostos isolados podem ser destacados cumarinas, peptídeos, antraquinonas, flavonoides, alcaloides, diterpenos, triterpenos e iridoídes. A avaliação destes compostos por bioensaios (por exemplo avaliação de atividade antimalárica, antimicrobiana, antitumoral) demonstraram propriedades farmacológicas promissoras com um grande potencial terapêutico<sup>143</sup>.

Mais de 100.000 produtos naturais são produzidos pelas plantas e o termo “produtos naturais” usualmente refere-se aos metabólitos secundários de baixo peso molecular. O metabolismo secundário da planta é definido como um termo para a via e para as pequenas moléculas do metabolismo que não são essenciais para a sobrevivência do organismo. Portanto, os metabólitos secundários são moléculas dispensáveis para o metabolismo e crescimento das plantas e são componentes-chave para a interação entre as plantas com o ambiente para adaptação às condições de estresse biótico e abiótico (Figura 3). Estas moléculas estão envolvidas na proteção contra herbívoros, bactérias, fungos, vírus e até mesmo outras plantas concorrentes<sup>144,145</sup>. Os metabólitos secundários de plantas são geralmente classificados de acordo com sua estrutura química<sup>146</sup> e podem ser divididos em três grandes grupos: (I) compostos fenólicos, feitos de açúcares simples, contendo anéis de benzeno, hidrogênio e oxigênio; (II) terpenóides, feitos de ácido mevalônico e compostos quase inteiramente de carbono e hidrogênio; e (III) alcalóides, compostos contendo nitrogênio<sup>147</sup> (Figura 4).

**Figura 3** - Fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários que podem ser utilizados para o desenvolvimento de fármacos



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 4** - Principais vias do metabolismo secundário de plantas

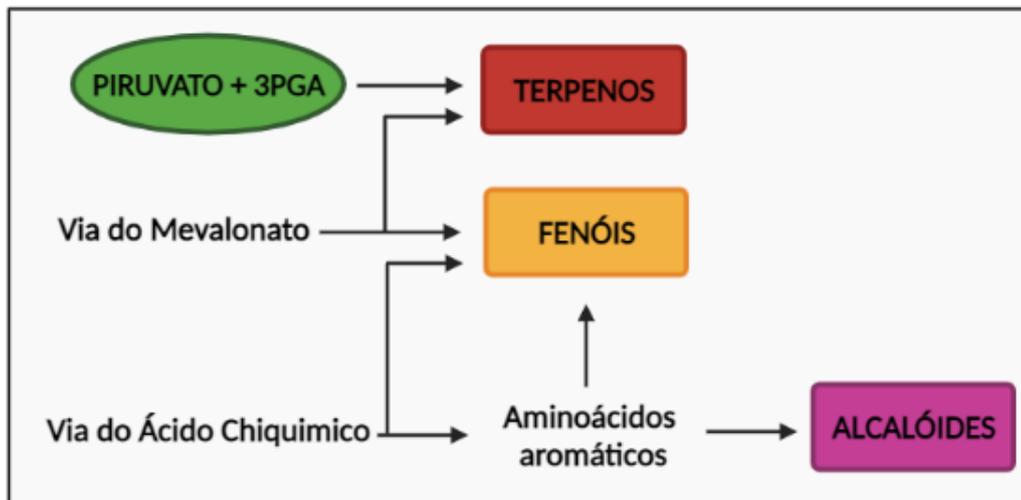


Diagrama representando as principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato ou 3PGA (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina).

Fonte: Adaptado de Chinou<sup>147</sup>, p. 61.

A farmacognosia é um dos métodos de investigação fitoquímico mais importante pois se concentra em produtos naturais (principalmente em materiais vegetais) e seus componentes que apresentam atividade biológica e, portanto, é de suma importância para a descoberta e/ou desenvolvimento de novos terapias<sup>148</sup>. A descoberta contemporânea de novos fármacos é baseada em grande parte na triagem de pequenas moléculas por sua capacidade de se ligar ou inibir alvos macromoleculares específicos (geralmente proteínas estruturais e enzimas)<sup>149</sup>. Os produtos naturais apresentam características especiais em comparação com moléculas sintéticas convencionais, o que confere vantagens e desafios para o processo de descoberta de fármacos. Por exemplo, normalmente os produtos naturais apresentam maior rigidez molecular em comparação com as bibliotecas de compostos sintéticos<sup>149-152</sup>, o que pode ser valioso na descoberta de fármacos para lidar com as interações com os alvos de interesse, pois a rigidez estrutural permite adequada interação entre molécula-sítio alvo<sup>53</sup>. Nas últimas duas décadas a comunidade científica intensificou os esforços na exploração de outros produtos para prevenção da cárie, principalmente de origem natural<sup>154,155</sup>. O reconhecimento dos fatores de virulência envolvidos na patogênese da cárie dentária e a descoberta de um agente natural que possa inibir de forma específica um ou mais desses fatores é uma abordagem atraente para prevenir doenças relacionadas ao biofilme dentário<sup>139</sup>.

### **3.7 Produtos Naturais no Controle da Cárie Dentária**

Muitos produtos naturais derivados de plantas possuem propriedades antimicrobianas, antibiofilme e/ou quimio-preventivas na modulação da formação de biofilme e podem inibir a desmineralização e aumentar a remineralização<sup>156</sup>. Outros efeitos biológicos dos produtos naturais estão relacionados principalmente à I) inibição da formação da matriz extracelular de biofilmes; II) supressão da adesão e fixação celular de microrganismos; III) interrupção da formação da matriz extracelular e, IV) diminuição da produção de fatores de virulência dos microrganismos em biofilmes. Dessa forma, pode ocorrer bloqueio da rede de formação e desenvolvimento do biofilme sem interromper os principais benefícios à saúde do microbioma oral residente<sup>157</sup>. O uso de plantas pode, portanto, ser uma terapia adjuvante aos métodos atuais para controle e prevenção da formação de biofilme dental e reduzir a alta incidência global de cárie dentária. Alguns ensaios sobre plantas, e suas respectivas atividades biológicas estão listados no Quadro 2.

**Quadro 2 - Exemplos de produtos naturais com atividade contra biofilmes cariogênicos**

| Fonte do produto natural                                      | Constituinte ativo  | Atividade biológica   | Referências  |
|---|---|---|--|
| Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )                    | Polifenóis (proantocianidinas, flavonóis, ácidos fenólicos, miricetina)               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- A aplicação tópica de 1 min, 2x/dia previne a adesão e colonização de patógenos envolvidos no desenvolvimento do biofilme cariogênico e a produção de ácido, a hidrofobicidade bacteriana, as atividades proteolíticas.</li> <li>- Afetam as proteínas de ligação ao glucano e as enzimas envolvidas na formação de biofilme (GtfB e GtfC principalmente);</li> </ul>  | Labrecque et al. <sup>158</sup> ; Koo et al. <sup>159</sup> ; Duarte et al. <sup>160</sup> ; Gregoire et al. <sup>161</sup>                                |
| Chá preto; chá verde; Chá Oolong ( <i>Camellia sinensis</i> ) | Polifenóis à base de catequinas, sendo a principal: Epigallocatequina-3-galato (EGCg) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduzem <i>in vitro</i> a síntese de glucanos solúveis e insolúveis em água após 1 h de exposição aos polifenóis do chá oolong</li> <li>- Reduzem o desenvolvimento de cárie em roedores infectados com <i>S. mutans</i> após ingestão frequente de chá verde;</li> <li>- Atividade antimicrobiana contra células planctônicas de <i>S. mutans</i> após 48h de exposição a 1mg/mL ao extrato de Oolong;</li> </ul>   | Nakahara et al. <sup>162</sup> ; Touyz et al. <sup>163</sup> ; Linke et al. <sup>164</sup> ; Sasaki et al. <sup>165</sup> ; Hirasawa et al. <sup>166</sup> |
| Favo de mel ( <i>Nidus Vespae</i> )                           | Cranberry, Quercetina, Kanferol   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Interfere com a via glicolítica e inibe o crescimento e o metabolismo bacteriano e a produção de ácido e a síntese de glucanos o que contribui para a menor formação da matriz extracelular do biofilme;</li> <li>- Após 4 h ou 24h, quercetina suprimiu a expressão de <i>gtfB</i> e <i>gtfC</i>, <i>comD</i> e <i>comE</i> (<i>quorum-sensing</i> e competência) e promove a expressão de <i>luxS</i> (<i>quorum-sensing</i>).</li> </ul>                  | Yue et al. <sup>167</sup> ; Yang et al. <sup>168</sup> ; Zeng et al. <sup>169</sup>  |
| Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )                       | Extrato bruto e fração metanólica   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Após 24h de exposição, reduziu a expressão dos genes <i>relA</i>, <i>gtfC</i>, <i>brpA</i> e <i>comDE</i>;</li> <li>- A exposição por 24h ao extrato, reduziu a adesão dependente de sacarose e independente de sacarose de <i>S. mutans</i> e reduziu a síntese de glucanos solúveis e insolúveis <i>in vitro</i>;</li> <li>- Após 24h de exposição, inibiu a atividade de F-ATPase e reduz o antígeno proteico de superfície (SpaP ou Ag I/II).</li> </ul> | Islam et al. <sup>170</sup> ; Hasan et al. <sup>171</sup>  |

**Continua**

| Fonte do produto natural                        | Constituinte ativo  | Atividade biológica   | Referências   |
|---|---|---|---|
| Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | Cineol, terpinen-4-ol   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atividade antimicrobiana contra células planctônicas de <i>S. mutans</i> após 24h de exposição ao óleo essencial;</li> <li>- Redução na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva humana após 5 min de exposição.</li> </ul>   | <p style="text-align: right;"><b>Continuação</b></p> <p>Groppo et al.<sup>172</sup>; Hammer et al.<sup>173</sup>; Takarada et al.<sup>174</sup></p> |
| Mini rosas ( <i>Galla Chinensis</i> )           | Extrato bruto hidroalcoólico das folhas (rico em taninos)                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Potenciais efeitos no equilíbrio de des/remineralização (<i>in vitro</i>) facilitando o transporte de íons para o corpo da lesão cariosa após exposição por 21 dias, 3x/dia por 3 min;</li> <li>- Redução da incidência de cárie de superfície lisa em modelo de roedores após tratamento tópico 2x/dia por 1 min.</li> </ul>  | Zou et al. <sup>175</sup> ; Zhang et al. <sup>176</sup> ; Cheng et al. <sup>177</sup> ; Wang et al. <sup>178</sup> ; Gabe et al. <sup>179,180</sup> |
| Própolis ( <i>Apis mellífera</i> )              | Apigenina, Miricetina, kaempferol, <i>tt</i> -farnesol                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>tt</i>-farnesol (56 a 112 µg/ml) exibiu efeito bactericida contra células planctônicas de <i>S. mutans</i> entre 8 h e 4 h de exposição;</li> <li>- <i>tt</i>-farnesol e apigenina (1 min/2x dia) reduziram a formação de biofilmes de <i>S. mutans</i> e conteúdo de EPS e interromperam com as propriedades acidogênicas/acidúricas de células planctônicas e de biofilme de <i>S. mutans</i></li> <li>- 1 mmol x L(-1) <i>tt</i>-farnesol (1 min/2x dia) reduziram a biomassa de biofilmes de <i>S. mutans</i>;</li> <li>- <i>tt</i>-farnesol e miricetina (10 min) reduziram o peso seco do, viabilidade celular e prevenção de quedas de pH em biofilmes de <i>S. mutans</i>.</li> </ul> | Koo et al. <sup>181,182,183</sup> ; Jeon et al. <sup>184</sup> ; Sims et al. <sup>185</sup>   |
| Amora branca ( <i>Morus alba</i> )              | Extrato bruto alcoólico das folhas e composto purificado (1-desoxinojirimicina) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- O extrato e composto purificado (125 e 15,6 mg/mL, respectivamente) apresentaram atividade antimicrobiana após 24h de exposição;</li> <li>- O extrato (15 mg/mL) inibiu a formação de biofilme de <i>S. mutans</i> após 20 e 24h de exposição;</li> <li>- O composto purificado (5 mg/mL) reduziu os polissacarídeos solúvel em álcali após 6 h de exposição.</li> </ul>   | Islam et al. <sup>186</sup>   |
| Alho ( <i>Allium sativum</i> )                  | Extrato bruto aquoso  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atividade antimicrobiana contra <i>S. mutans</i> após 24h de exposição ao extrato (142,7 mg/mL)</li> <li>- Após 40h de exposição, o extrato bruto (8 mg/mL e 16 mg/mL), promoveu regulação positiva da expressão de glucosiltransferases de <i>S. mutans</i>.</li> </ul>   | Bakri et al. <sup>187</sup> ; Lee et al. <sup>188</sup>   |

**Continua**

| Fonte do produto natural                       | Constituinte ativo  | Atividade biológica  | Referências  |
|--|---|--|--|
| Alcaçuz ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )          | Extrato bruto aquoso e alcoólico da raiz  | - Em 24h de exposição, o extrato alcoólico (12,5 mg/mL) apresentou atividade antimicrobiana contra células planctônicas de <i>S. mutans</i> comparável ao enxaguatório bucal com clorexidina, enquanto é significativamente maior em comparação com a forma aquosa (20 mg/mL) e o enxaguatório fluoretado.   | <b>Continuação</b><br>Malvania et al. <sup>189</sup> |
| Guaçatonga ( <i>Casearia sylvestris</i> )      | Extrato bruto hidroalcoólico e frações das folhas   | - Os extratos (500 µg/mL) e frações (250 µg/mL) apresentaram atividade antimicrobiana contra células planctônicas de <i>S. mutans</i> após 24h de exposição aos tratamentos;<br>- A mesma concentração de extratos e frações reduziu a população e biomassa de biofilmes de <i>S. mutans</i> após 24h de exposição aos tratamentos;<br>- Os extratos (500 µg/mL) afetam a atividade de GtfB e reduzem a quantidade de glucanos insolúveis produzidos após 1h de exposição aos tratamentos. | Ribeiro et al. <sup>23</sup>                         |
| Margarida do campo ( <i>Aspilia foliácea</i> ) | Diterpenos de caurano: ácido ent-kaur-16(17)-en-19-óico (KA) e ácido 15-beta-isovaleriloxi-ent-kaur-16(17)-en-19-óico (KA-lval) | - Atividade antimicrobiana contra células planctônicas de <i>S. mutans</i> após 24h de exposição aos compostos purificados (0,1 µg/mL).  | Ambrosio et al. <sup>190</sup>                       |

Fonte: Elaboração própria.

Cerca de 80% da população mundial depende de produtos de origem natural para tratar alguma doença e a maioria dos medicamentos fitoterápicos contém pelo menos uma molécula botânica<sup>191</sup> e as plantas têm sido utilizadas como terapias naturais benéficas à saúde bucal, algumas delas com propriedades antimicrobianas e com potencial para reduzir infecções bucais<sup>156</sup>. Muitos agentes biocidas naturais, como extratos de plantas fluidos ou secos, têm sido incorporados em produtos de higiene bucal. Por exemplo, extratos de miswak, óleos de melaleuca, óleos essenciais, hortelã-pimenta e chá verde foram adicionados a enxaguantes bucais e cremes dentais para melhorar suas atividades antimicrobianas gerais<sup>192,193</sup>. Um levantamento etnobotânico mostrou que 47 espécies de plantas são utilizadas na região de Altiplano do México para o tratamento de doenças dentárias como dor de dente, cárie dentária, doença periodontal e gengivite<sup>194</sup>.

A incorporação de produtos naturais em tratamentos para prevenção de cárie pode reduzir os custos terapêuticos, ao mesmo tempo em que causa efeitos colaterais mínimos. Alguns estudos demonstram que extratos brutos de plantas ou compostos isolados de produtos naturais apresentam efeito similar ou superior aos quimioterápicos sintéticos na inibição de biofilmes cariogênicos<sup>189,195</sup>. Os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados e a atividade antimicrobiana destes compostos está relacionada ao número e posição dos substituintes no anel benzênico, pois a saturação e o comprimento das cadeias laterais podem influenciar o potencial antimicrobiano contra patógenos orais<sup>196</sup>. Os compostos fenólicos têm capacidade de reduzir a síntese de glucanos, além de interferir a atividade F-ATPase<sup>197,198</sup>. Compostos de nitrogênio heterocíclicos são chamados de alcalóides e são extremamente tóxicos apesar de apresentar efeito terapêutico significativo em baixas concentrações. Os alcaloides puros, isolados de plantas e seus derivados sintéticos são utilizados para fins analgésicos, antiespasmódicos e bactericidas. Um dos mecanismos da ação antimicrobiana dos alcalóides é a supressão da citocinese do patógeno<sup>199</sup>. Os terpenos (também conhecidos como terpenóides) são a maior classe química de ativos vegetais<sup>200</sup>. Dentro desta classe, *tt*-farnesol é amplamente estudado quanto ao potencial anticárie e porque é capaz de aumentar a permeabilidade das membranas bacterianas aos prótons e reduzir a atividade glicolítica de *S. mutans* em biofilmes<sup>183,184</sup>.

Apesar dos esforços para identificar os supostos agentes antimicrobianos e/ou antibiofilme de produtos naturais, ainda há uma grande lacuna quanto aos

mecanismos precisos de ação e eficácia. Algumas das abordagens para avaliar a atividade de um possível agente anticárie apresentam desafios. Por exemplo, os microrganismos na cavidade oral nunca seriam expostos a uma concentração constante de um agente antimicrobiano introduzido exogenamente durante um período de 24 horas<sup>184</sup>. A menos que um composto tenha uma excelente substantividade, é improvável que os microrganismos na cavidade oral sejam expostos a altas concentrações de um tratamento por mais de 30 segundos a alguns minutos. Outra possibilidade é o carreamento de composto (s) por sistemas de liberação de fármacos (adequados para a cavidade oral) para prolongar o tempo de exposição à uma concentração adequada.

A nanotecnologia baseada em sistemas de liberação de fármacos responsivas ao pH (ou transportadores de nanopartículas, NPCs) foi desenvolvida para aumentar a eficácia do antibiofilme, aumentando a substantividade<sup>201</sup> este sistema de entrega de fármacos foi estudado para a entrega de *tt*-farnesol<sup>202,203</sup>, uma combinação de *tt*-farnesol e miricetina<sup>201</sup> e uma combinação de *tt*-farnesol, miricetina e composto 1771<sup>204</sup>. Porém, cabe ressaltar que os ensaios *in vitro* baseados em modelos fundo de placa, como a determinação Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) ou prospecção usando uma única concentração de diversos agentes naturais, é de grande relevância quando empregados em técnicas de biotriagem de alto rendimento<sup>139,205</sup>. Ainda, é importante ressaltar que poucos estudos foram realizados *in vivo* (por exemplo, usando modelos de cárie de roedores) e ainda menos foram avaliados em nível clínico<sup>18</sup>. O último levantamento disponível encontrou um número de 56 ensaios clínicos realizados e a maioria deles se concentrou na avaliação dos efeitos antimicrobianos dos produtos testados, principalmente em *S. mutans* e, em menor grau, em outras espécies microbianas ou fúngicas<sup>18</sup>. Outro ponto é que a maior parte dos estudos dos produtos fitoterápicos avaliados foram derivados de uma única espécie vegetal, enquanto em um número menor de ensaios foram utilizadas formulações complexas obtidas de três ou mais espécies distintas<sup>154</sup>.

Ainda, apenas uma pequena parte atinge a fase clínica e se torna comercialmente disponível<sup>18</sup>. Isto ocorre devido aos longos ciclos de desenvolvimento de produtos encontrados na indústria farmacêutica. O longo atraso, geralmente dez anos ou mais, entre a descoberta inicial de um potencial agente terapêutico e o lançamento subsequente no mercado de uma nova entidade molecular (ou seja, um

novo fármaco) significa que os agentes que chegam ao mercado hoje são tipicamente produtos de programas de pesquisa de descoberta iniciados há pelo menos um uma década atrás<sup>149</sup>. A complexidade dos extratos brutos e a natureza química dos componentes neles encontrados são grandes desafios na descoberta e desenvolvimento de novos bioativos. Além disso, as várias etapas de purificação e bioensaios adicionais são necessários para a identificação e isolamento dos componentes ativos de uma gama de moléculas excepcionalmente complexa. Esta etapa é trabalhosa, tecnicamente desafiadora e demorada. Portanto, há a necessidade de elucidação estrutural e determinação de fórmula molecular, o que é tecnicamente viável usando as técnicas espectroscópicas atuais<sup>18,23,205</sup>.

A purificação é uma etapa limitante porque os métodos de separação devem ser projetados para produzir quantidades suficientes da molécula bioativa pura da fonte natural original e se destaca como uma das preocupações fundamentais na descoberta de medicamentos de produtos naturais. Outro ponto é a composição química dos produtos de origem natural, esta depende da localização geográfica, efeitos sazonais e diversidade biológica, o que pode influenciar drasticamente a atividade biológica e a potência das amostras<sup>139</sup>. Portanto é necessário que haja uma fonte confiável e reproduzível de coleta e purificação do produto natural. Assim, é fundamental trabalhar em estreita colaboração com taxonomistas de plantas locais ou nativas e grupos de pesquisa para obter amostras representativas de acordo com o período e local de coleta, além disso, realizar a identificação das plantas ou outras fontes naturais e após a coleta, armazenar as amostras livre de umidade e calor para evitar qualquer degradação ou alterações enzimáticas e identificar as amostras com precisão e a autenticidade deve ser confirmada por um taxonomista<sup>23,205</sup>.

Embora seja um campo desafiador, a busca por novas modalidades de tratamento é necessária devido a (1) resistência microbiana; (2) toxicidade a curto e longo prazo; (3) efeitos adversos e efeitos colaterais; (4) custos elevados para o usuário final; (4) comprometimento sustentabilidade da produção industrial em larga escala. Portanto, parece consensual que existe uma necessidade de desenvolvimento de produtos com maior eficácia, que apresentem baixo custo, sejam seguros para aplicação em odontologia<sup>18,155</sup>.

### 3.8 *Casearia sylvestris*

*C. sylvestris* SW. (família Salicaceae) é uma excelente representante do gênero *Casearia* Jacq. Popularmente conhecida no Brasil como “guaçatonga”, termo originado da língua tupi-guarani, o que indica um antigo uso desta espécie em comunidades indígenas brasileiras<sup>206</sup>. *C. sylvestris* tem alta capacidade adaptativa que permite sua proliferação no Brasil e do México ao Uruguai. No Brasil, esta espécie ocorre nos biomas Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga e Pantanal<sup>207</sup>. Baseado em sua morfologia, 2 variedades são reconhecidas como *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*<sup>208</sup>. *C. sylvestris* var. *sylvestris* é encontrada na Mata Atlântica brasileira, é uma árvore com mais de 2 m de altura, enquanto *C. sylvestris* var. *lingua* é um arbusto encontrado no bioma Cerrado<sup>208</sup>. No Brasil e outros países da América Latina, *C. sylvestris* é utilizada como extratos brutos de folhas e infusões na medicina popular. É empregado principalmente no tratamento de acidentes ofídicos, doenças de pele, diarreias, inflamações, febres e úlceras gástricas, entre outros<sup>19,209</sup>. Devido à sua relevância etnofarmacêutica, *C. sylvestris* é uma das 71 espécies vegetais listadas na Lista de Plantas Medicinais de Interesse da Saúde Única Brasileira Sistema – RENISUS<sup>210</sup>.

Encontra-se à venda produtos à base de *C. sylvestris*, sendo alguns destinados ao uso odontológico. O ANAPYON por exemplo (Figura 5 A), é um antisséptico bucal composto por tirotricina, clorofila, hortelã, ácido tânico e tintura de *C. sylvestris* e é indicado para inflamações bucais, laringites, estomatites e gengivites, tratamento de aftas, mau hálito e amigdalites<sup>211</sup>. Também é comercializado um dentifrício de *C. sylvestris* sem flúor, fabricado pelo Laboratório Panizza<sup>212</sup>. O fabricante descreve os benefícios diferenciais do dentifrício como sendo propriedades anestésiante, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antisséptica e auxílio no combate à halitose e aftas (Figura 5 B). Também é disponível comercialmente o extrato fluído de *C. sylvestris* indicado para auxiliar no tratamento de herpes labial, infecções fúngicas bucais e micoses, úlceras estomacais, reumatismo, inflamações e picadas de cobra e insetos<sup>213</sup> (Figura 5 C). No entanto, na literatura não há estudos clínicos confirmando a eficácias desses produtos.

Figura 5 - Produtos à base de *C. sylvestris*



ANAPYON – frasco com 100 mL; custo médio de R\$ 32,00 em 04/07/22; **B.** Dentífrício com *C. sylvestris* – custo médio R\$ 23,00 em 25/11/22; **C.** Extrato Fluido de *C. sylvestris* ofertado na internet – frasco com 30mL; custo de R\$ 25,00 em 25/11/22.

Investigações fitoquímicas de extratos de folhas de *C. sylvestris* levaram à descoberta de diterpenos tricíclicos oxigenados (marcadores taxonômicos para o gênero) dentre eles as casearinas A-X, a caseargrewiina F, as casearvestrinas A-C entre outros<sup>214-217</sup>. Alguns derivados de taninos também foram identificados<sup>218,219</sup>, bem como 14 flavonóides 3-O-glicosilados e derivados de catequinas foram recentemente isolados das folhas de *C. sylvestris* var. *lingua*, fornecendo a primeira pista sobre seu metabolismo diferenciação de *C. sylvestris* var. *sylvestris*<sup>220</sup>.

As atividades biológicas de extratos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* têm sido extensivamente estudadas<sup>23-26</sup>. Bioensaios demonstram que as atividades antiúlcera, antiinflamatórios, antiparasitários e antitumorais de *C. sylvestris* se atribuem ao conteúdo terpenoidal de clerodano<sup>19,20,27</sup>. Poucos estudos foram realizados quanto ao seu potencial antimicrobiano<sup>28-30</sup>, bem como pouco está elucidado quanto à sua atividade biológica contra microrganismos patogênicos encontrados na cavidade bucal<sup>31,32</sup>. Além disso, a maioria dos estudos biológicos de *C. sylvestris* empregaram a var. *sylvestris* e até o momento, a var. *lingua* não foi o foco principal das investigações fitoquímicas<sup>220</sup>.

Diante disso, nossos estudos têm se voltado na triagem de extratos brutos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* de diferentes biomas e variedades. A inclusão dessas duas variáveis (bioma e variedade) é vital, pois influenciam na variabilidade da composição química dos metabólitos secundários<sup>22</sup>. Recentemente,

demonstramos que extratos brutos e frações de *C. sylvestris* inibem o crescimento de microrganismos associados à patogênese da cárie dentária e os extratos inibem a atividade de GtfB *in vitro*. Este foi o primeiro passo para a identificação de novos inibidores de alvos específicos de crescimento de *S. mutans* presentes em *C. sylvestris*<sup>23</sup>. Além disso, fornecemos um modelo de triagem de compostos ativos de origem de plantas<sup>205</sup>. Baseado em nossas descobertas iniciais e como parte de nossos esforços contínuos para explorar o potencial desta planta contra os patógenos responsáveis pela cárie dentária, neste trabalho avaliamos o efeito extratos brutos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* para controle de biofilme cariogênico de *S. mutans*. Para identificar os possíveis mecanismos de ação destes tratamentos, utilizamos diferentes modelos e tempos de exposição e realizamos análises da expressão de genes de virulência. Os estudos de triagem de produtos naturais são necessários para (i) identificar novos compostos para desenvolvimento de fármacos; (ii) confirmar o uso etnomedicinal das plantas e (iii) desenvolver fitomedicamentos<sup>221</sup>. Cabe ressaltar que uso etnobotânico de *C. sylvestris* também envolve a sua utilização em arborização de ruas e de sua madeira na construção civil, trabalhos de torno, tacos, tábuas para assoalho, marcenaria, carpintaria, lenha e carvão<sup>222</sup>.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia executada visando ao alcance dos objetivos deste trabalho está descrita detalhadamente a seguir.

### 4.1 Coleta e Preparo dos Extratos Brutos de *C. sylvestris*

A planta foi registrada no Sistema Nacional de Manejo de Recursos Genéticos e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen; Registro #A00892A) e todas as coletas realizadas com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por meio do Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO; Registro nº 33429–1). Em setembro e outubro de 2019 foram coletas nos municípios de Araraquara/SP e Brasília/DF as folhas e frutos de 04 árvores de *C. sylvestris*, pertencentes ao bioma Cerrado e variedades (var.) *lingua*, *sylvestris* e intermediária (n=5). Em dezembro de 2020 foram realizadas coletas no município de Presidente Venceslau-SP de folhas e galhos de 7 espécimes da var. *sylvestris* do bioma Mata Atlântica. A seleção das amostras foi baseada em estudos anteriores<sup>22,23,25,220</sup>. As informações sobre as amostras estão descritas no Quadro 3 e as imagens das amostras na Figura 6.

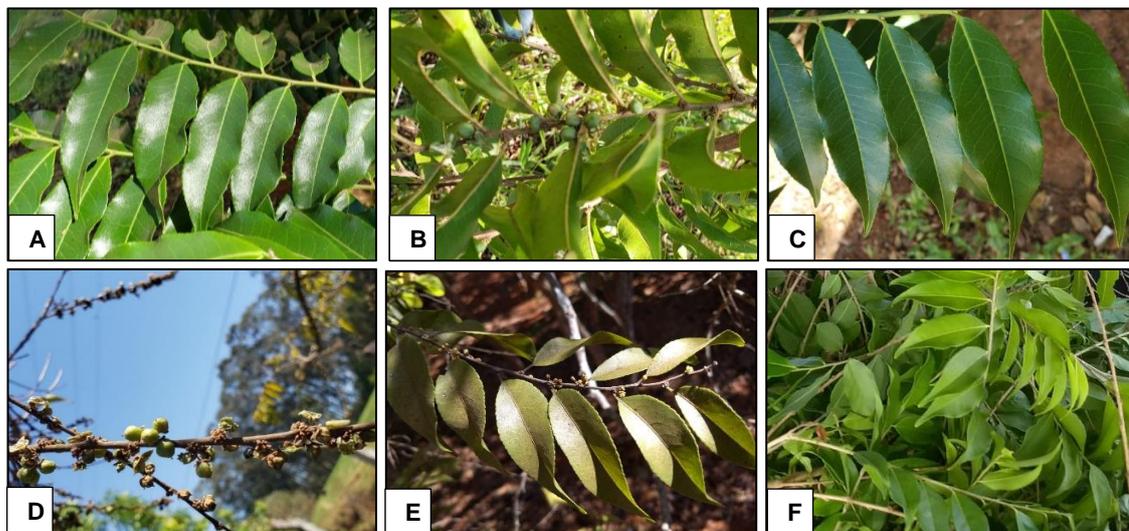
**Quadro 3** - Espécimes de *C. sylvestris* coletadas em diferentes locais e biomas brasileiros

| População               | Amostra | Variedade <sup>1</sup> | Bioma          | Parte | Localização   |
|-------------------------|---------|------------------------|----------------|-------|---|
| Araraquara/SP           | ARA/SP  | <i>lingua</i>          | Cerrado        | Folha | Associação Servidores Campus Araraquara – Ascar (21°49'08.7"S 48°11'48.1"W)                 |
| Araraquara/SP           | ARA/SP  | <i>lingua</i>          | Cerrado        | Fruto | Associação Servidores Campus Araraquara – Ascar (21°49'08.7"S 48°11'48.1"W)                 |
| Araraquara/SP           | ARA/SP  | <i>sylvestris</i>      | Cerrado        | Folha | Associação Servidores Campus Araraquara – Ascar (21°49'08.7"S 48°11'48.1"W)                 |
| Araraquara/SP           | ARA/SP  | intermediária          | Cerrado        | Folha | Instituto de Química, UNESP (21°48'25.0"S 48°11'33.2"W)                                     |
| Brasília/DF             | BRA/DF  | <i>lingua</i>          | Cerrado        | Folha | Universidade de Brasília – UNB (15°45'49.4"S 47°54'23.4"W)                                  |
| Presidente Venceslau/SP | PRE/SP  | <i>sylvestris</i>      | Mata Atlântica | Folha | Estrada de terra, na altura do Km 622 da Rodovia Raposo Tavares (21°51'36.0"S 51°56'29.8"W) |
| Presidente Venceslau/SP | PRE/SP  | <i>sylvestris</i>      | Mata Atlântica | Galho | Estrada de terra, na altura do Km 622 da Rodovia Raposo Tavares (21°51'36.0"S 51°56'29.8"W) |

Variedade baseada em classificação botânica<sup>1</sup>.

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 6** - Exemplos das folhas e frutos dos espécimes coletados de *C. sylvestris* mostrando detalhes anatômicos



Exemplos das folhas e frutos de dos espécimes coletadas de *C. sylvestris*. **A.** Exemplo de ARA/SP da var. *sylvestris*. **B.** Exemplo ARA/SP da var. *lingua*. **C.** Exemplo de ARA/SP da var. *intermediaria*. **D.** Exemplo dos frutos de ARA/SP var. *lingua*. **E.** Exemplo de BRA/DF da var. *lingua*. **F.** Exemplo de PRE/SP var. *sylvestris*.

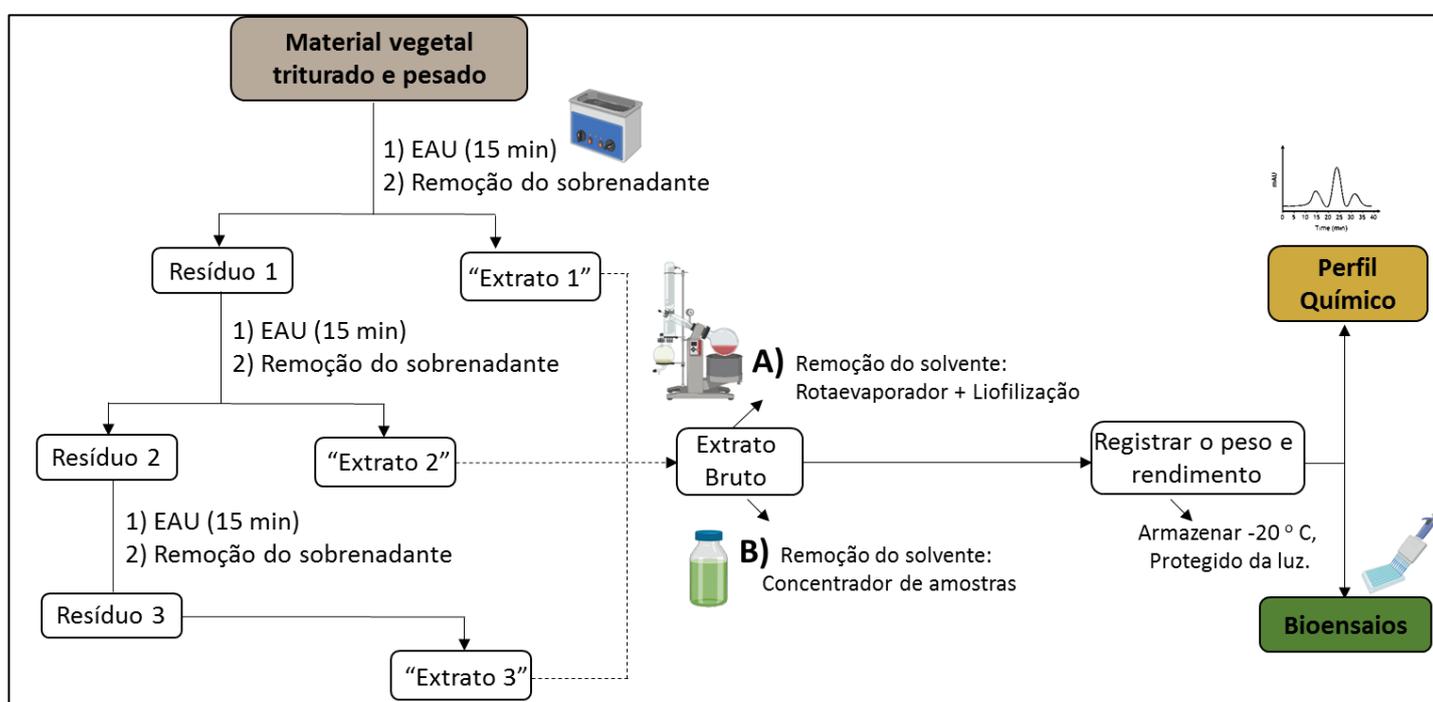
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

O preparo e o fracionamento dos extratos brutos foram realizados no Instituto de Química (IQ) da Unesp, Araraquara. Para tanto, as folhas foram manualmente separadas dos galhos e dos frutos e o material vegetal foi desidratado (40°C em estufa de ar circulante). Todas as amostras foram identificadas com o local e data de colheita, variedade e parte constituinte (folha/galho/fruto). Após a desidratação, as amostras foram trituradas individualmente e armazenadas em sacos hermeticamente fechados à temperatura ambiente até seu preparo.

Após triturado, o material vegetal foi individualmente pesado para posterior extração, o preparo dos extratos brutos está ilustrado na Figura 7. Para tanto, 20 g de amostra de cada uma das populações foram extraídas três vezes utilizando-se porções de 120, 60 e 40 mL de um solvente extrator contendo água, etanol (EtOH) e álcool isopropílico (J.T. Baker, EUA) na proporção de 5:3:2 (volume/volume), com o auxílio de banho de ultrassom (15 min) entre cada rodada de extração e em seguida filtradas. Por fim, os extratos brutos foram combinados e liofilizados; e alíquotas de 20 mL foram armazenadas em duplicatas em tubos Falcon de 50 mL<sup>22,23,205</sup>. Após liofilizadas, as amostras dos extratos brutos foram pesadas e armazenadas a -20°C protegidas de luz até seu uso. O mesmo material vegetal foi utilizado para uma

diferente abordagem de preparo de extratos brutos. Após a extração, alíquotas de 10 mL dos extratos foram adicionados em triplicata em frascos de vidro (previamente pesados) e em seguida, o solvente extrator foi evaporado em concentrador de amostras (Speed Vac modelo SPD, Thermo Scientific). As amostras foram pesadas e após, realizado o cálculo de rendimento (%) dos extratos brutos (Quadros 1 e 2 do Apêndice A). Em seguida, as amostras destinadas aos bioensaios propostos neste estudo, foram eluídas em 84,15% etanol (EtOH; Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO) e 15% dimetilsulfóxido (DMSO- Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO) como detalhado no Quadro 3 do Apêndice A. Após, foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

**Figura 7-** Fluxograma da extração do material vegetal



Desenho experimental do preparo dos extratos brutos. **(A)** Remoção dos solventes através de rotaevaporador seguido de liofilização das amostras; **(B)** Remoção dos solventes através do concentrador de amostra. EAU: Extração Assistida por Ultrassom.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.1.2 Fracionamento dos extratos brutos de *C. sylvestris*

Buscando otimizar os rendimentos das frações, duas metodologias foram adotadas para o fracionamento. Na primeira, o fracionamento foi realizado a partir dos extratos brutos liofilizados e em seguida, as frações resultantes foram secas no concentrador de amostras (metodologia 1). Na segunda, o fracionamento foi realizado a partir dos extratos brutos secos no concentrador de amostras e em seguida, as

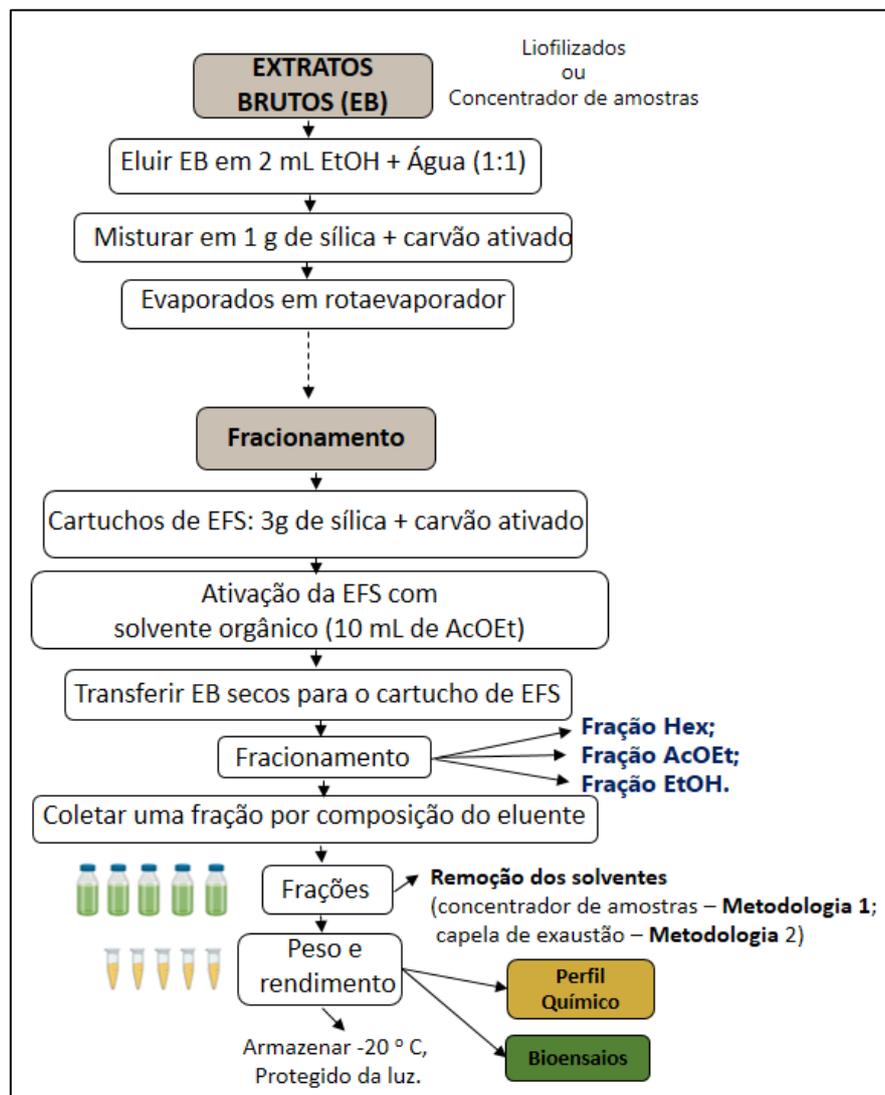
frações obtidas foram secas na capela de exaustão (metodologia 2). O fracionamento foi realizado segundo a metodologia descrita por Ribeiro et al.<sup>23</sup>, resumidamente, foi preparado 20 g de uma mistura de sílica gel 40-63  $\mu\text{m}$ , 60 Å (Merck, Alemanha) e carvão ativado (LABSYNTH, Brasil) na proporção 1:1. Em seguida, 3g dessa mistura foi adicionada em cartuchos de extração em fase sólida. As colunas foram previamente condicionadas com 10 mL acetato de etila (J.T. Baker, grade HPLC). Os extratos brutos secos foram eluidos com 2 mL de uma solução de EtOH e água na proporção 1:1 (v/v) e em seguida adicionados à uma mistura contendo 1 g da mistura de carvão e sílica 1:1.

Então, os solventes foram evaporados em um aparelho rotaevaporador e em seguida as amostras foram aplicadas no cartucho de extração<sup>22</sup>. A primeira fração foi eluída com hexano/AcOEt 95:05 (10 mL), a segunda fração foi eluída com 10 mL acetato de etila 100% (fração AcOEt) e a terceira fração com etanol (EtOH) puro. Após, os solventes foram evaporados em um concentrador de amostras (Speed Vac modelo SPD, Thermo Scientific). Para a segunda metodologia, após a completa evaporação do solvente extrator em concentrador de amostras, os mesmos foram eluidos em EtOH e água (1:1; v/v) como descrito para metodologia 1. Após aplicados nas colunas previamente condicionadas, as frações permaneceram na capela de exaustão até completa evaporação do solvente (Figura 8). As frações obtidas por ambas metodologias foram pesadas e após, realizado o cálculo de rendimento (%) baseado na massa inicial dos extratos brutos (Quadros 4, 5 e 6 do Apêndice A). Em seguida, as amostras destinadas aos bioensaios propostos neste estudo, foram eluídas em 84,15% EtOH e 15% DMSO, como detalhado no Quadro 7 do Apêndice A. Após, foram mantidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Para os extratos brutos de folhas (F) e galhos (G) de PRE/SP, foi também realizado fracionamento dos extratos por extração em fase sólida usando uma mistura de sílica (Si-C18) com carvão ativado (2:1 g/g) como adsorventes (frações EFS-C18). A fase estacionária foi composta por 30 g de sílica C18, empacotada a seco em tubo de polipropileno com 3,7 cm de diâmetro interno (Sílica Polygoprep® 60-50 C18, 50  $\mu\text{m}$ ; Macherey-Nagel). Para aplicação e eluição da amostra, o extrato bruto seco foi disperso em C18 e depositado sobre o adsorvente. A eluição foi realizada com Água/EtOH nas proporções 95:05, 60:40, 40:60 e 20:80 e em seguida com EtOH puro, com auxílio de vácuo, utilizando-se cerca de 150 mL de cada eluente.

As cinco frações obtidas para cada extrato foram secas sob fluxo de N<sub>2</sub> e em seguida liofilizadas. As frações obtidas desses fracionamentos foram divididas em duas alíquotas, sendo uma destinada às análises químicas e outra para os estudos de atividade biológica. Ao final as amostras foram pesadas para cálculo de rendimento (Quadro 8 em Apêndice A). As informações sobre a eluição das frações estão descritas no Quadro 9 em Apêndice A. Após a eluição de cada extrato bruto e fração, a solução de trabalho dos mesmos foram avaliados quanto ao seu valor de pH para certificar-se que todos os tratamentos e controle veículo não apresentavam diferença em relação a este parâmetro (Quadros 10 e 11 em Apêndice A).

**Figura 8 - Fluxograma do fracionamento dos extratos brutos**



Desenho experimental do fracionamento dos extratos brutos. EFS: Extração em Fase Sólida. Hex: fração hexânica. AcOEt: fração acetato de etila. EtOH: fração etanólica.

Fonte: Elaboração própria.

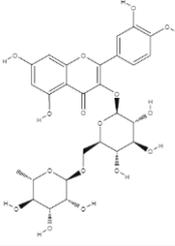
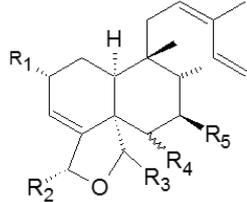
#### 4.1.3 Flavonoide e casearinas isolados de *C. sylvestris*

Foram selecionadas 4 moléculas isoladas das folhas *C. sylvestris*. Estas moléculas foram isoladas dos extratos brutos e frações que anteriormente foram triados em nosso estudo <sup>21</sup>. As moléculas são: Flavonoide 4, Caseargrewiina F, Casearinas X e J (Quadros 4 e 5). A separação das moléculas foi realizada e descrita por Bueno et al.<sup>220</sup>. Resumidamente, folhas em pó de *C. sylvestris* var. *lingua* foram sucessivamente extraídas três vezes, à temperatura ambiente, usando 175 mL de uma mistura 50:30:20 (v/v) de água/etanol/isopropanol e após a evaporação do álcool, os extratos foram liofilizados para obtenção de extrato bruto seco. Uma porção (3 g) deste extrato foi fracionada usando um sistema de cromatografia de média pressão (Puriflash 4100, Interchim) equipado com duas colunas flash C-18 (Puriflash C18HQ, 15 µm, 35 g, Interchim).

A eluição foi realizada usando um gradiente de água (A) e metanol (B). As frações foram combinadas e liofilizadas para produzir 2,3 g de material seco. Este material seco foi submetido a extração em fase sólida com poliamida, e a fração metanólica resultante foi seca para dar 113 mg de matéria seca. Finalmente, a fração metanólica foi dissolvida em água/acetonitrila (80:20, volume/volume) e filtrada através de um filtro de nylon de 0,22 µm (Millipore) e fracionada por HPLC preparativa usando um Shimadzu LC - 8<sup>a</sup> equipado com um controlador SCL-10Avp e um detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp<sup>220</sup>.

As moléculas foram separadas em uma coluna cromatográfica Luna C-18 (5 µm, 150 × 21,5 mm, Phenomenex) usando eluição isocrática com uma mistura 80:20 (volume/volume) de água/acetonitrila contendo 0,1% (volume/volume) de fórmica ácido. O volume de injeção e a taxa de fluxo foram de 0,4 mL e 10 mL/min, respectivamente. Nestas condições, 15 moléculas foram isoladas e a identificação presuntiva foi conseguida para dez delas usando espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) e MS/MS em modo negativo (micrOTOF-Q II, Bruker Daltonics). Para cinco das substâncias (1-5), a elucidação estrutural foi realizada por meio de análises de RMN 1H, 13C e 2D (Bruker Advance III HD 600, 14.7T), a fim de confirmar as identidades e o padrão de glicosilação<sup>220</sup>. Para os bioensaios propostos neste estudo, as moléculas foram eluídas com o veículo diluente (EtOH e DMSO), como descrito em Quadro 12 em Apêndice A. Após, foram mantidos a -20°C até sua utilização.

**Quadro 4** - Estrutura dos flavonoides e diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris*

| Substância  | Estrutura Química   | Referência  |
|---|---|---|
| Flavonoide 4<br>(Quercetin-3-O-rutinoside – Rutina) |  | Bueno et al. <sup>220</sup>                                     |
| Caseargrewiina F                                    |  | Bueno et al. <sup>22</sup> ,<br>Passareli et al. <sup>223</sup> |
| Casearina X   |   |   |
| Casearina J   |   |   |

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 5** - Diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris* e seus substituintes R1 a R5

| Casearinas       | R1  | R2  | R3  | R4 | R5  |
|------------------|-----|-----|-----|----|-----|
| Caseargrewiina F | OBu | OAc | OAc | OH | H   |
| Casearina X      | OBu | OBu | OAc | OH | H   |
| Casearina J      | OMe | OBu | OAc | OH | OBu |

Substituintes das casearinas representadas no Quadro 2 e utilizadas no estudo, onde: OBU = grupo  $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{CO}_2$ ; OMe = grupo  $\text{OCH}_3$  (metoxila); grupo OAc =  $\text{CH}_3\text{CO}_2$  (acetato); OH = grupo O-H (hidroxila); H = hidrogênio.

Fonte: Adaptado de Bueno et al.<sup>22</sup>.

## 4.2 Cepa e Crescimento Microbiano

Estoques de *S. mutans* cepa UA159 (ATCC 700610) armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  (caldo triptona de soja contendo 20% de glicerol (volume/volume); Synth, Diadema, SP, Brasil) foram descongelados e semeados em placas de ágar sangue (5% sangue de carneiro; Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) e incubados a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  por 48h (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Após, para preparar as culturas iniciais (pré-inóculo), 10 colônias foram inoculadas em caldo de triptona-extrato de levedura (TY; 2,5% triptona, 1,5% extrato de levedura, pH 7,0; % peso/volume, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) contendo glicose a 1% (Synth, Diadema, SP, Brasil), seguida de incubação por 16h ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Em seguida, o pré-inóculo foi diluído 1:20 em TY + 1% glicose e incubado até a fase de crescimento exponencial médio ou *mid-log* [densidade óptica ou  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  0,847 ( $\pm 0,273$ ) e unidades formadoras de

colônias por mililitro (UFC/mL)  $1,37 \times 10^9$  ( $\pm 6,10 \times 10^7$ ); Espectrofotômetro Kasvi, Pequim, China)]. Os inóculos para os ensaios aqui descritos foram preparados com uma população definida de  $2 \times 10^6$  UFC/mL em TY + 1% glicose para ensaios antimicrobianos e TY + 1% sacarose (% peso/volume, Synth, Diadema, SP, Brasil) para ensaios de biofilme.

### **4.3 Atividade Antimicrobiana (Cultura Planctônica) Através de Modelo de Longa Exposição (24h)**

Para as análises, os extratos brutos foram avaliados em uma concentração única de 500  $\mu\text{g/mL}$ <sup>23</sup>. Essas concentrações foram utilizadas em função do rendimento de extratos e frações e da literatura científica, que considera adequados estudos com 1 mg/mL para extratos ou 0,1 mg/mL para compostos isolados<sup>224</sup>. Para tanto, a cepa foi cultivada até a fase *mid-log* de crescimento, como descrita acima e então, 100  $\mu\text{L}$  dessa cultura de *S. mutans* ( $2 \times 10^6$  UFC/mL) foram transferidos para microplacas de 96 poços (Kasvi, Pequim, China) contendo concentrações de teste de tratamentos ou veículo (controle com diluente de tratamentos) e meio de cultura (TY + 1% glicose), totalizando 200  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). Cada experimento incluiu o seguinte conjunto de controles: poços contendo apenas meio de cultura, poços contendo apenas o inóculo do experimento (controle de crescimento microbiano) e poços contendo o inóculo mais veículo (ou 0  $\mu\text{g/mL}$ ; sendo a concentração em cada poço 1,75% EtOH e 0,31% DMSO)<sup>23</sup>. As microplacas foram então incubadas (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e após a incubação, foi realizada a análise visual dos poços (turbidez: crescimento microbiano, claro: sem crescimento), seguida da leitura de DO<sub>562nm</sub> (Leitor de placas ELISA, Biochrom Ez, Camboune, Reino Unido). Aqui, a maioria dos tratamentos complexou quando em contato com o meio de cultura, tornando a inspeção visual e leituras de densidade ótica subjetivas, e a maioria não apresentou efeito claro dose-dependente. Portanto, estes dados não são apresentados neste trabalho. Para determinar a viabilidade das células microbianas, foi utilizada uma alíquota de cada poço para diluição seriada de 10 vezes ( $10^0$  a  $10^{-5}$ ) em microtubos contendo solução salina (0,89% NaCl; Química Moderna, Barueri, SP, Brasil) e alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram usadas para semeadura em duplicata em placas de ágar BHI (Himedia, Dindhori, Nashik, Índia) e incubadas (48h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) seguido pela contagem de colônias. Os dados de UFC foram transformados em  $\log_{10}$  e analisados

em relação ao controle do veículo. Cada tratamento foi realizado em triplicata em duas ocasiões distintas ( $n=2$ )<sup>23,205</sup>.

#### **4.4 Atividade Antibiofilme Através de Modelos de Longa Exposição (24h)**

A atividade antibiofilme dos extratos brutos 500 µg/mL, frações (250 µg/mL e 500 µg/mL) e moléculas (125 µg/mL) foi investigada<sup>23,224,225</sup>. Esta análise foi realizada através de duas configurações de exposições aos tratamentos: **I)** Atividade contra a formação inicial de biofilme (incubação dos agentes com as células desde o início da formação dos biofilmes até a análise após 24h) para extratos brutos, frações Hex; AcOEt e EtOH e frações EFS-C18 e; **II)** Atividade contra biofilme pré-formado (biofilmes de 24h foram expostos a tratamentos por 24h, produzindo biofilmes de 48h) para frações AcOEt\_BRA/DF e EtOH\_BRA/DF, Flavonoide 4, Caseargrewiina F e Casearinas X e J.

##### **4.4.1 Atividade contra a formação inicial de biofilme (biofilmes de 24h)**

Para biofilmes com 24h de idade, os tratamentos foram introduzidos no tempo 0 h, e os biofilmes foram avaliados em 24h de desenvolvimento para avaliar a inibição da formação de biofilme. Biofilmes foram formados em poços de microplacas de poliestireno para verificar a população viável (UFC/biofilme) de células bacterianas em biofilmes tratados por extratos brutos ou frações<sup>205</sup>. Em uma placa de 96 poços, 100 µL de inóculo de *S. mutans* (com  $2 \times 10^6$  UFC/mL) foram adicionados a cada poço, contendo as concentrações de teste e meio de cultura (TY + 1% sacarose), totalizando 200 µL ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). Para cada experimento foram incluídos os mesmos controles descritos no **item 4.3**, porém, aqui, o meio de cultura foi TY + 1% sacarose. Além disso, a concentração do controle veículo em cada poço foi 1,75% EtOH e 0,31% DMSO para os extratos brutos, enquanto para as frações AcOEt, EtOH e Hex foi 5,26% EtOH e 0,94% DMSO e para as frações EFS-C18, 2,63% EtOH. A placa foi incubada (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e, em seguida, foi realizada a análise visual dos poços e a placa foi incubada sob agitação orbital (5 min, 75 rpm, 37°C; Quimis, G816 M20, São Paulo, BR). O meio de cultura com células não aderidas foi aspirado e descartado. Para remover o restante de células não aderidas, os biofilmes remanescentes nos poços foram lavados (três vezes) com o auxílio de uma pipeta e 200 µL de solução de NaCl 0,89% (esse material foi descartado). Em seguida, esses biofilmes (aderidos no

fundo dos poços) foram raspados por 5 vezes com auxílio de pontas de pipeta com 200 µL de NaCl 0,89%, totalizando 1 mL de suspensão de biofilme (de cada poço). Essa suspensão de biofilme foi transferida para microtubos esterilizados e submetida a diluições seriadas ( $10^0$  a  $10^{-5}$ ), que foram semeadas em duplicatas em placas de BHI. As placas foram incubadas (48h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e após, realizada a contagem de colônias. Em seguida, os dados UFC foram transformados em log<sub>10</sub> e analisados em relação ao controle do veículo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata (n= 2).

#### 4.4.2 Atividade contra biofilmes pré-formados (biofilmes de 48h)

Para avaliar a prevenção do acúmulo de biofilme (biofilmes de 48h), biofilmes foram formados em poços de microplacas de poliestireno sem adição de nenhum tratamento ou controle de veículo (sendo a concentração em cada poço 5,26% EtOH e 0,94% DMSO). Após 24h, os biofilmes formados foram expostos a tratamentos com substâncias teste e controles por 24h (biofilmes de 48h). Então, os biofilmes foram avaliados em 48h de desenvolvimento para verificar a inibição da formação de biofilme por análise de população viável (UFC/biofilme)<sup>226</sup>. Para as análises, foram adicionados a poços de placas de 96 poços 50 µL de inóculo de *S. mutans* (contendo  $2 \times 10^6$  UFC/mL) e 50 µL de TY + 1% sacarose (para obter  $1 \times 10^6$  UFC/mL). A microplaca foi incubada (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) sem qualquer tratamento ou controle de veículo. Após a incubação e formação do biofilme, foi realizada a análise visual, seguida da remoção do meio de cultura e lavagem dos biofilmes remanescentes (três vezes com 200 µL de solução de NaCl 0,89%). Em seguida, adicionou-se meio de cultura fresco TY + 1% sacarose e concentrações de teste dos tratamentos (AcOEt\_BRA/DF - 250 µg/mL e compostos - 125 µg/mL e controle veículo (5,26% EtOH e 0,94% DMSO). Para cada experimento foram incluídos os mesmos controles descritos no **item 4.3**. A microplaca foi novamente incubada (24h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após a incubação (quando os biofilmes tinham 48h), foi realizado o mesmo protocolo de processamento aplicado para biofilmes de 24h até obter 1 mL de suspensão de biofilme. As suspensões de biofilme foram sonicadas (30 s, 7 w, Sonicator QSonica, Q125, Newtown, CT, EUA), submetidas a diluições seriadas ( $10^0$  a  $10^{-5}$ ) e semeadas em ágar BHI seguida de contagem de colônias. Em seguida, os dados da UFC foram transformados em log<sub>10</sub> e analisados em relação ao controle do veículo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata (n= 2).

#### **4.5 Análise do Efeito de Soluções sobre Biofilmes Formados em Discos de Hidroxiapatita Revestidos com Saliva (Exposição Breve)**

Nesta etapa, os tratamentos selecionados (dados “promissores” para a atividade do antibiofilme em biofilmes iniciais e biofilmes pré-formados) foram usados para preparar soluções combinadas com e sem fluoreto de sódio (NaF). Essas soluções foram então avaliadas através do tratamento tópico em discos de hidroxiapatita revestidos de saliva (sHA)<sup>195</sup>. Assim, as frações selecionadas foram AcOEt\_BRA/DF, EFS-C18 Água/EtOH 40:60 (G3.3a) e Água/EtOH 60:40 (F4.2b), enquanto o composto foi CsF.

##### **4.5.1 Formação de película salivar sobre superfície de hidroxiapatita**

Foram utilizados discos de hidroxiapatita com área de superfície de  $2,7 \pm 0,2 \text{ cm}^2$  (Clarkson Chromatography Products, Inc.) como superfície de formação de película salivar para mimetizar o esmalte dentário. Foram utilizados dois discos revestidos por película salivar (discos sHA) para cada grupo experimental<sup>227</sup>. A saliva total foi estimulada de 2 voluntários saudáveis (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição Sede, CAAE: 26015019.3.0000.5416; Número do Parecer: 3.771.091– ANEXO B) e diluída 1:1 (volume/volume) com tampão de adsorção [tampão AB: 0,05 M KCl; 0,02 M KPO<sub>4</sub>; 0,02 M CaCl<sub>2</sub>; 0,02 M MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo), em H<sub>2</sub>O destilada e deionizada, pH 6,5], após a saliva diluída foi centrifugada (20 min, 3220 xg ou 4000 rpm, 4°C) e esterilizada por filtração (0,22 µm filtro de membrana de polietersulfona de baixa ligação de proteína, Rapid-flow Nalgene Thermo Scientific, México).

Para os ensaios, os discos foram posicionados verticalmente em poços de placas de poliestireno de 24 poços com auxílio de aparato confeccionado com fio ortodôntico, a fim de evitar efeito de depósitos microbianos devido à gravidade<sup>9,228</sup>. Um volume de 2,8 mL de saliva estéril foi adicionado em cada poço da placa e cada aparato com os discos de hidroxiapatita (pré-hidratados em água MiliQ estéril) foi transferido para a placa. Em seguida, a placa com os aparatos posicionados foi incubada em agitador orbital (1h, 75 rpm, 37°C, Quimis G816M20) para formação da película.

Os aparatos contendo discos sHA foram então lavados 3 vezes em tampão AB e tratados (tratamento da película) e transferidos para meio de cultura inoculado, conforme descrito a seguir.

#### 4.5.2 Tratamento da película, formação de biofilmes e tratamento dos biofilmes

O tratamento tópico dos discos sHA consistiu em gotejar 300 µL de cada solução ou controle veículo nos discos correspondentes (dois discos por tratamento e por experimento) durante 1,5 min ou 10 min<sup>229,230,7</sup>. As soluções utilizadas para tratar topicamente os biofilmes estão descritas no Quadro 6. Ainda, no Quadro 7 está representado um exemplo dos cálculos utilizados para o preparo das soluções.

**Quadro 6** - Soluções aplicadas nos biofilmes formados sobre discos sHA

| SOLUÇÕES  | TEMPO DE TRATAMENTO (MIN) |
|---|---------------------------|
| G3.3a - 1000 µg/mL                              | 1,5                       |
| G3.3a - 1000 µg/mL + NaF 250                    |                           |
| G3.3a - 500 µg/mL + F4.2b - 500 µg/mL           |                           |
| G3.3a - 500 µg/mL + F4.2b - 500 µg/mL + NaF 250 |                           |
| NaF 250   |                           |
| Veículo   |                           |
| AcOEt_BRA/DF - 250 µg/mL                        | 10                        |
| AcOEt_BRA/DF - 250 µg/mL + NaF 250              |                           |
| AcOEt_BRA/DF - 1000 µg/mL                       |                           |
| AcOEt_BRA/DF - 1000 µg/mL + NaF 250             |                           |
| NaF 250   |                           |
| Caseargrewiina F - 125 µg/mL                    | 10                        |
| Caseargrewiina F 125 µg/mL + NaF 250            |                           |
| Caseargrewiina F - 250 µg/mL                    |                           |
| Caseargrewiina F 250 µg/mL + NaF 250            |                           |
| NaF 250   |                           |

G3.3 a designa a fração EFS-C18 Água/EtOH 40:60; F4.2b designa a fração EFS-C18 Água/EtOH 60:40; NaF 250 é fluoreto de sódio a 250 ppm e Veículo diluente 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 7** - Cálculo para o preparo das soluções

| Solução          | Volume de Fração - 2 mg/mL (para 250 µg/mL) | Volume NaF 5000 ppm (para 250 ppm) | Tampão fosfato 2,5 mM para completar 300 µL |
|------------------|---|------------------------------------|---|
| AcOEt_BRA/DF     | 150 µL                                      | -                                  | 150 µL tampão fosfato pH 6,2                |
| AcOEt + NaF 250  | 150 µL                                      | 15 µL                              | 135 µL tampão fosfato pH 6                  |
| NaF 250          | 150 µL do Veículo diluente                  | 15 µL                              | 135 µL tampão fosfato pH 6                  |
| Veículo diluente | 150 µL                                      | -                                  | 150 µL tampão fosfato pH 6,2                |

Exemplo para volume de 300 µL necessário para tratar os biofilmes topicamente. NaF 250 é fluoreto de sódio a 250 ppm e veículo diluente 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e tampão fosfato a 2,5 mM.

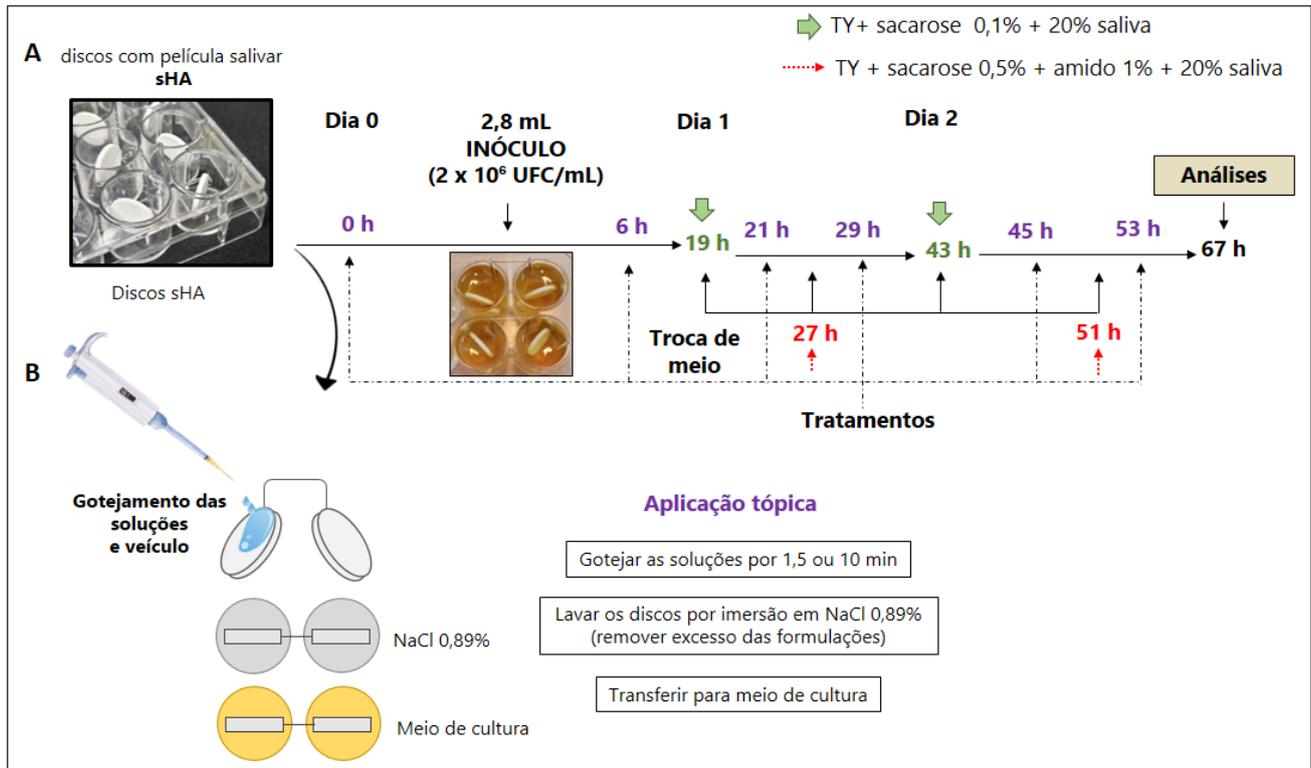
Fonte: Elaboração própria.

Cada solução foi preparada imediatamente antes do início de cada tratamento tópico, ainda, o gotejamento foi realizado com auxílio de uma pipeta, cuidando para que todas as superfícies dos discos recebessem o tratamento. Após, os discos tratados foram lavados por imersão em poços contendo tampão AB e transferidos para uma placa de 24 poços (Kasvi, Pequim, China) contendo cultura de *S. mutans* para formação de biofilme (tempo 0h). Aqui, as culturas de *S. mutans*, em fase *mid-log* de crescimento exponencial, foram diluídas em TY + 0,1% de sacarose e 20% de saliva para atingir  $2 \times 10^6$  UFC/mL. As placas foram então incubadas por 6h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), após, os discos com biofilme inicial foram enxaguados por 3 vezes em NaCl 0,89% e novamente tratados com cada solução ou controle correspondente (como descrito para sHA), enxaguados por 3 vezes em 0,89% de NaCl (para remover o excesso de tratamento), e transferido de volta para o meio de cultura correspondente até os biofilmes terem 19h de idade, quando o meio de cultura foi trocado.

Os tratamentos tópicos foram aplicado na película salivar (discos sHA) em 0 h (momento prévio à inoculação) e nos biofilmes em 6h, 21h, 29h, 45h e 53h (Figura 9). Os biofilmes foram cultivados até atingirem 67h e então foram processados para análise de população microbiana, biomassa e análises bioquímicas de seus componentes. O meio de cultura foi trocado às 19h, 27h, 43h e 51h e após cada mudança de meio, o pH do meio gasto foi medido. Portanto, em cada ocasião experimental foram realizadas duas trocas de meio de cultura por dia de experimento, com auxílio de pinça clínica estéril para movimentar os aparatos do meio “velho” para o meio “novo”, duas vezes ao dia<sup>228</sup>, utilizando um modelo de “escassez e fartura” de nutrientes, com desenvolvimento do biofilme até 67h<sup>195</sup>, como descrito a seguir:

- **19 h de incubação (7h30 do dia 1):** os discos foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY com 0,1% de sacarose e 20% saliva;
- **27 h de incubação (15h30 do dia 1):** os discos foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY com 0,5% de sacarose, 1% amido e 20% saliva;
- **43 h de incubação (7h30 do dia 2):** os discos foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY com 0,1% de sacarose e 20% saliva;
- **51 h de incubação (15h30 do dia 2):** os discos foram transferidos para poços contendo meio de cultura TY + 0,5% de sacarose, 1% amido e 20% saliva;
- **67 h de incubação (7h30 do dia 3):** os aparatos com os discos de HA com os biofilmes foram transferidos para poços contendo NaCl 0,89%.

**Figura 9 -** Desenho experimental para o regime de tratamento tópico



**A.** Desenho experimental para o regime de tratamento (roxo) e horário das trocas de meio de cultura. Em verde, meios de cultura contendo meio de cultura TY com 0,1% de sacarose e 20% saliva. Em vermelho meio de cultura TY com 0,5% de sacarose + 1% amido e 20% saliva. Cada sequência de 67 horas é chamada de ocasião. **B.** Ilustração do tratamento tópico dos discos de hidroxiapatita revestidos por película salivar. O tratamento tópico consistiu no gotejamento das soluções (ou controle veículo) sobre todas as faces dos discos, sequencialmente (Horev et al.<sup>202</sup>).

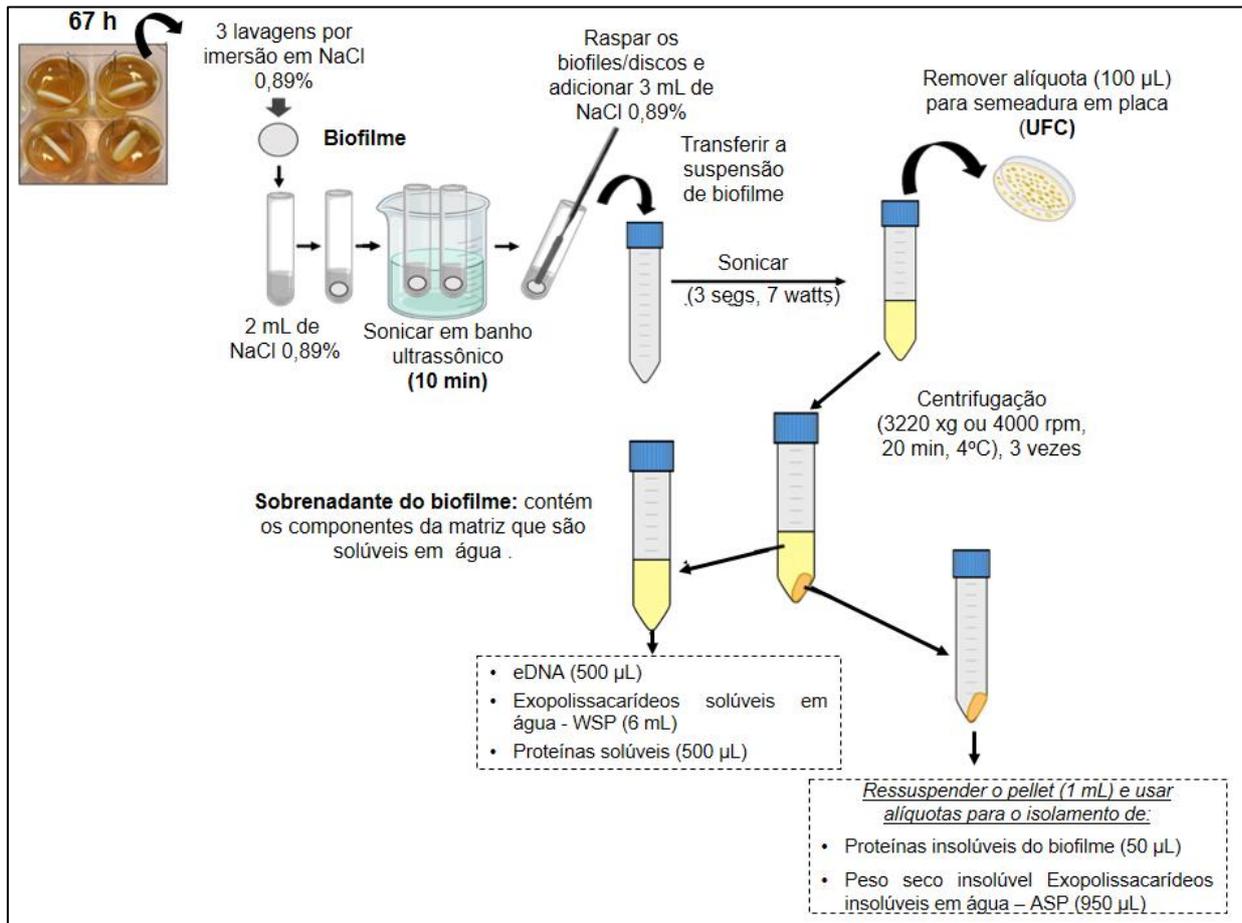
Fonte: Elaboração própria.

#### 4.5.3 Processamento dos biofilmes e métodos padrão de análises bioquímicas (colorimétricas) e método de cultivo microbiano

Foram utilizados métodos padrão de análises bioquímicas (colorimétricas) para determinar conteúdo total de proteínas (na porção solúvel e na porção insolúvel), conteúdo de EPS (solúveis e insolúveis em água) e método de cultivo bacteriano para determinação da biomassa do biofilme (peso seco) e população. Ainda, foi avaliada a quantidade de eDNA na matriz<sup>195</sup>. O processamento dos biofilmes ocorreu conforme ilustrado na Figura 10. Para tanto, em 67h de formação, os biofilmes foram lavados 3 vezes por imersão em NaCl 0,89%. Após, os discos foram removidos e transferidos para tubos de vidro contendo NaCl 0,89%, então, as paredes de cada tubo foram lavadas com NaCl 0,89%. Os tubos com biofilmes/discos foram colocados em um béquer contendo água MilliQ e então submetidos à sonicação em cuba ultrassônica

(modelo CD-4820, Kondentech Digital) por 10 min, para remoção dos biofilmes dos discos. Em seguida, com uma espátula nº 24 estéril, os biofilmes residuais de cada superfície do disco foram raspados e a suspensão transferida para tubos Falcon (15 mL).

**Figura 10** - Diagrama do processamento de biofilmes para análises microbiológica e bioquímicas



Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, cada tubo de vidro foi lavado com NaCl 0,89% e este volume foi transferido para o tubo correspondente inicial. O volume final foi homogeneizado com sonda (30 seg, 7 watts). Alíquotas de 100 µL de cada suspensão foram submetidas a diluições seriadas e semeadas em placas de ágar sangue. As placas foram incubadas (48h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e então realizada a contagem de colônias nas placas para determinar o número de UFC/biofilme. O volume restante de suspensão de cada biofilme foi centrifugado (3220 xg ou 4000 rpm, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi armazenado em outro tubo (tubo Falcon de 15 mL - sobrenadante) e o *pellet* (precipitado celular com os componentes insolúveis da matriz) foi lavado com 2,6 mL de água Mili-Q (3220 xg ou 4000 rpm, 20 min, 4°C). Após, o sobrenadante foi

misturado no mesmo tubo Falcon de 15 mL. A lavagem foi repetida com mais 2,6 mL de água e o sobrenadante também armazenado (sobrenadante total será de 10 mL). Os sobrenadantes armazenados foram usados para quantificar: polissacarídeos solúveis em água ou WSP (6 mL – adicionou-se 18 mL de etanol 99% para precipitação dos polissacarídeos); para eDNA (500 µL) e proteínas solúveis (em água) presentes na matriz (500 µL). Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de água Mili-Q estéril. Deste volume, foi retirada uma alíquota de 50 µL para quantificação de proteínas na porção insolúvel do biofilme (armazenada em freezer -80°C); 950 µL para polissacarídeos insolúveis em água, mas solúveis em álcali (ASP) e para o peso seco insolúvel<sup>13</sup>. Este conteúdo foi transferido para microtubos pré-pesados em balança de alta precisão (Mettler Toledo AE 50).

#### 4.5.4 Peso seco insolúvel dos biofilmes

O volume de 950 µL foi transferido para microtubos pré-pesados, centrifugados (15294 xg ou 12000 rpm; 4°C; 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Após, o *pellet* foi desidratado em concentrador de amostras (modelo RVC 2-18C D, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Os microtubos foram pesados novamente em balança de alta precisão (Mettler Toledo AE 50) e o peso seco do biofilme foi calculado, em biomassa. Todos os *pellets* desidratados foram armazenados para extração de ASP.

#### 4.5.5 Quantificação de proteínas totais do biofilme e da matriz

A quantificação de proteínas no biofilme (porção insolúvel) e na matriz (porção solúvel) foi realizada utilizando o método de Bradford, seguindo o protocolo para microplacas, descrito no *Technical Bulletin* da Sigma\*.

##### a) Proteínas na porção insolúvel do biofilme

Para verificar a quantidade de proteínas, foram utilizadas alíquotas de 5 µL de cada amostra em triplicata (em placa de 96 poços), que foram misturadas com 250 µL do reagente de Bradford. Para isso, as alíquotas de cada biofilme separadas para

---

\* Cf. [http://www.chem.uky.edu/courses/che554/2\\_Photometry/SigmaBulletin\\_b6916bul.pdf](http://www.chem.uky.edu/courses/che554/2_Photometry/SigmaBulletin_b6916bul.pdf)).

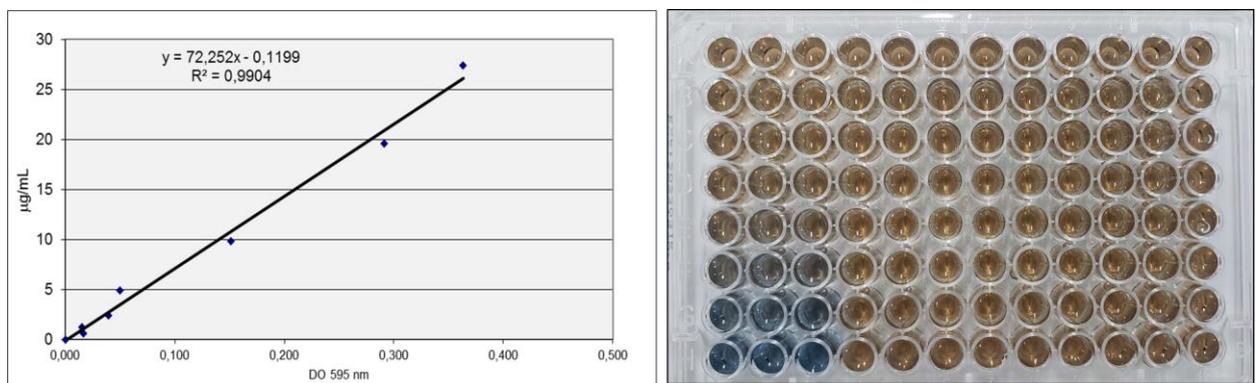
proteína total foram diluídas na proporção 1:5 com água MiliQ (adição de 40 µL de água MiliQ aos 10 µL de biofilme, seguido da adição de bolinhas de vidro). Após, as amostras foram incubadas (100°C, 1000 rpm, 1h - Banho seco - 980FIHSCTSUS – Fisher Scientific). Realizou-se curva padrão, utilizando-se padrão BSA (Sigma) a 200 mg/mL, diluído à 2 mg/mL; e esta solução foi utilizada para construção dos pontos da curva (Tabela 1). Em seguida, alíquotas de 5 µL de cada amostra da curva foram colocadas na placa de poliestireno com 96 poços (na mesma contendo as amostras), seguido de adição de 250 µL de Bradford (sem diluição); cada placa foi colocada na incubadora orbital por 20 min a 37°C. A leitura de proteínas foi realizada em leitor de ELISA com DO<sub>595nm</sub>. Após a leitura, os valores da curva padrão foram plotados para obtenção da equação de reta e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup> próximo a 1, Figura 11). Os valores de DO das amostras de biofilme foram convertidos em concentração de proteínas totais no biofilme.

**Tabela 1** - Construção dos pontos da curva com a solução padrão de BSA e água MiliQ

| Mg/mL   | Volume de BSA à 2mg/mL (µL)<br>(Solução padrão) | Volume de água MiliQ (µL) |
|---------|---|---------------------------|
| 0,00000 | 0,000   | 1000,00                   |
| 0,03125 | 15,625  | 984,37                    |
| 0,06250 | 31,250  | 968,75                    |
| 0,12500 | 62,500  | 937,50                    |
| 0,25000 | 125,000   | 875,00                    |
| 0,50000 | 250,000   | 750,00                    |
| 1,00000 | 500,000   | 500,00                    |

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 11** - Curva padrão e escala colorimétrica para proteínas



Curva padrão para proteínas. **A.** Análise dos dados com DO<sub>595nm</sub> onde observamos correlação linear positiva (Absorbância vs. Concentração de proteínas); **B.** Ilustração da escala colorimétrica: Teste de Bradford. A coloração azul na placa denota maior concentração de proteína. DO: densidade óptica.

Fonte: Elaboração própria.

#### b) Proteínas na matriz extracelular (porção solúvel do biofilme)

Para avaliar as proteínas na matriz, 500 µL do sobrenadante de cada amostra estavam reservados e 5 µL dos mesmos foram misturados com 250 µL de Bradford em placa de 96 poços (em triplicata). A curva padrão de BSA foi construída como descrito acima, e 5 µL de cada ponto da curva padrão foram colocados em placa de 96 poços, e após foram adicionados 250 µL de Bradford (sem diluição), em triplicata. Em seguida, cada placa foi colocada na incubadora orbital por 20 min a 37°C. A leitura de proteínas foi realizada em leitor de ELISA (Biochrom Ez read 400) com DO<sub>595nm</sub>. Após a leitura, os valores da curva padrão foram plotados para obtenção da equação de reta e coeficiente de correlação ( $R^2$  próximo a 1). Os valores de DO das amostras de biofilme foram convertidos em concentração de proteínas totais no biofilme.

#### 4.5.6 Quantificação de eDNA na matriz extracelular

Para a extração do eDNA foi utilizado o *Kit MasterPure™ Purification* (EPICENTRE). Após descongelar 0,5 mL da amostra de sobrenadantes reservados para isolar eDNA, adicionou-se 0,5 mL de 2X TCL (reagente do kit), seguido de incubação (65°C, 15 min e 300 rpm; Banho seco - 980FIHSCTSUS – Fisher Scientific). As amostras foram resfriadas em gelo por 5 min. Após, adicionou-se 150 µL de MPC (reagente para precipitação de proteínas), seguido de agitação, em vórtex (por 10 s). As amostras foram centrifugadas (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C; Centrífuga 5430R, Eppendorf); e o sobrenadante transferido para um microtubo novo. Caso o sobrenadante não estivesse límpido (precipitado soltando), adicionou-se mais 25 µL de MPC, seguido de centrifugação das amostras (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C) novamente para obtenção de sobrenadantes límpidos a serem transferidos (conforme instruções do fabricante). Aos sobrenadantes foram adicionados 1000 µL de isopropanol, seguido de agitação por inversão dos tubos (40 vezes) e precipitação em freezer a -20°C (por no mínimo 18h). Após, as amostras foram centrifugadas (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C) e o isopropanol descartado, sem desalojar o *pellet* de cada amostra. As amostras foram enxaguadas com etanol 75% (200 µL), seguidas de centrifugação (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C). O etanol foi descartado sem desalojar o *pellet* (este passo foi repetido duas vezes). As amostras foram lavadas com etanol 99%, centrifugadas (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C) e o etanol descartado. Os tubos foram deixados virados abertos sobre papel

absorvente para a completa evaporação do etanol. Após, adicionou-se 30 µL de TE (Tris-EDTA; pH 8,0) aos tubos para hidratação das amostras por 1h. Em seguida, as amostras foram quantificadas, em triplicata, à 260 nm usando nano-espectrofotômetro (DS-11+, Denovix).

#### 4.5.7 Exopolissacarídeos solúveis em água (WSP) na matriz extracelular

Para a quantificação de exopolissacarídeos solúveis em água, ao total de 6 mL de sobrenadante de cada biofilme, foram adicionados 18 mL de etanol a 99% (Sigma). Os tubos foram armazenados em freezer a -20°C durante no mínimo 18 h para precipitação de WSP. Os tubos foram centrifugados (10414 xg ou 9000 rpm, 20 min, 4°C, Centrífuga 5810R, Eppendorf) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 5 mL de etanol a 70%, e as paredes do tubo foram “raspadas” com a ponta de uma ponteira para misturar bem os polissacarídeos. Os tubos foram centrifugados novamente (10414 xg ou 9000 rpm, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e este passo foi repetido duas vezes. Após as lavagens, os tubos foram virados abertos sobre papel absorvente e deixados em bancada para a completa evaporação do etanol. Então, adicionou-se 1 mL de água MiliQ e os tubos foram guardados em geladeira até a realização do ensaio colorimétrico proposto por Dubois et al.<sup>231</sup>. Para esse ensaio, curvas padrão de glicose foram realizadas, utilizando água MiliQ e glicose a 0,1%, em poços de placas de poliestireno de 96 poços. As concentrações de glicose utilizadas e volumes correspondentes estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Curva padrão de glicose para quantificação de WSP

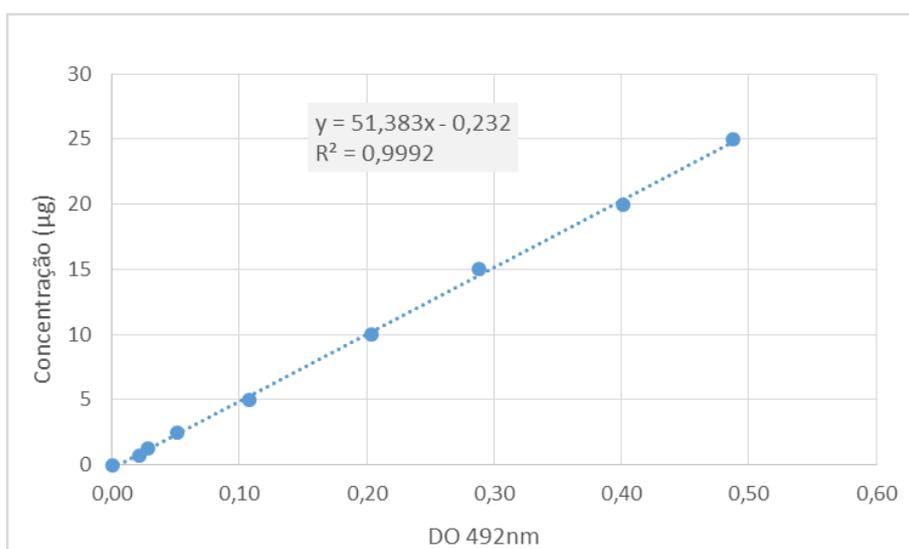
| Volume<br>(µL)    | Concentração de glicose (µg) |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-------------------|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                   | 0                            | 0,75   | 1,25   | 2,5    | 5      | 10     | 15     | 20     | 25     |
| Água              | 200,00                       | 199,25 | 198,75 | 197,50 | 195,00 | 190,00 | 185,00 | 180,00 | 175,00 |
| Glicose<br>a 0,1% | 0,00                         | 0,75   | 1,25   | 2,50   | 5,00   | 10,00  | 15,00  | 20,00  | 25,00  |
| Total             | 200,00                       | 200,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 | 200,00 |

Fonte: Elaboração própria.

Foram transferidos 25 µL de amostras de cada ponto da curva padrão para poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, dentro de uma capela de exaustão de gases, com o auxílio de dispensador de repetição (Eppendorf), foram adicionados 25 µL de fenol 5% (fresco, diluído com água MiliQ; Fenol liquefeito a 89%, Sigma, #108-

95-2 do catálogo P9346), seguido de homogeneização e adição de 125 µL de ácido sulfúrico PA (Synth), em que este último foi adicionado sob agitação. A placa foi mantida dentro da capela de exaustão de gases por 20 min (tempo necessário para finalização da reação bioquímica). Em seguida, a placa foi lida em leitor ELISA (DO<sub>492nm</sub>). Os dados da curva padrão foram analisados. Os procedimentos somente foram iniciados após os dados da curva estarem dentro das normas de inclinação (R<sup>2</sup> próximo a 1; Figura 12). Terminada a calibração, foram feitas as análises dos biofilmes em poços de placas de poliestireno de 96 poços contendo 25 µL de cada amostra. Como realizado para obtenção da curva padrão, volumes correspondentes de fenol 5% e ácido sulfúrico PA foram adicionados a cada poço contendo as amostras. Os valores de DO<sub>492nm</sub> foram verificados, anotados, e, após, convertidos em concentração de WSP utilizando-se a equação de reta gerada em cada curva realizada para cada experimento. Em seguida, o cálculo do total de WSP em cada biofilme foi realizado, e esses dados foram utilizados para análise descritiva.

**Figura 12 - Curva padrão para WSP e ASP**



Análise dos dados com DO<sub>492nm</sub>, onde observa-se correlação linear positiva.

Fonte: Elaboração própria.

#### **4.5.8 Exopolissacarídeos insolúveis em água (ASP) na matriz**

Conforme mencionado acima, os *pellets* utilizados para verificar o peso seco de cada biofilme (995 µL) foram utilizados para extrair os exopolissacarídeos insolúveis em água. De acordo com o peso de cada *pellet*, adicionou-se 300 µL de

NaOH a 1 M (Química Moderna) por mg de peso seco em cada tubo. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado em vórtex e incubado em banho seco (37°C, 2h, 75 rpm). Após 10 min da incubação, os microtubos foram homogeneizados em vórtex e continuou-se com a incubação. Em seguida, os tubos foram centrifugados (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C; centrífuga 5430R, Eppendorf) e o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo correspondente. Novamente, foram adicionados 300 µL de NaOH 1 M para cada mg de peso seco do pellet. Seguido de agitação em vórtex e incubação, como realizado inicialmente. Após, os microtubos foram centrifugados (15294 xg ou 12000 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante de cada amostra foi transferido para o mesmo microtubo correspondente. Os procedimentos foram repetidos, porém sem a incubação por 2h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido no microtubo correspondente e o pellet de cada amostra foi descartado. Os microtubos foram guardados em geladeira (4°C) até a realização do ensaio colorimétrico, como descrito para WSP.

Terminada a calibração da curva padrão, foram feitas as análises dos biofilmes em poços de placas de poliestireno de 96 poços contendo 12,5 µL de cada amostra, misturada com 12,5 µL de água. Como realizado para obtenção da curva padrão, volumes correspondentes de fenol 5% e ácido sulfúrico PA foram adicionados a cada poço contendo as amostras. Os valores de  $DO_{492nm}$  foram verificados, anotados, e após, convertidos em concentração de ASP, utilizando-se a equação de reta gerada em cada curva realizada para cada experimento. Em seguida, o cálculo do total de ASP em cada biofilme foi realizado, e esses dados foram utilizados para análise descritiva.

#### **4.5.9 Análise via microscopia de fluorescência (confocal)**

Para as soluções PRE/SP, foram desenvolvidos biofilmes como descrito acima para análise da morfologia 3D e organização estrutural desses biofilmes tratados. A análise de morfologia 3D e organização estrutural desses biofilmes tratados com soluções PRE/SP foi realizada em 67h. Para marcação de EPS foi usado um método baseado na incorporação de dextranos marcados com Alexa Fluor® 647 (10 kDa; 647/668 nm; Molecular Probes) pelas enzimas Gfts durante a formação de EPS (glucanos)<sup>232,233</sup>. Para a visualização da matriz foi adicionado dextrano fluorescente (1 µM) em 2,8 mL de meio de cultura a partir do início (0 h) e durante o desenvolvimento dos biofilmes. Quando o biofilme atingiu 67h, SYTO® 9 foi usado para marcar as bactérias nestes biofilmes (citar o volume usado e o tempo de incubação). Para a

aquisição das imagens, os discos foram transferidos para placas de Petri com fundo em lamínula, contendo NaCl a 0,89%. As imagens foram adquiridas com um microscópio confocal de varredura à laser (Zeiss LSM800, com detector Multialkali-PMT, laser 488 nm (SYTO9) e 561 nm (Alexa Flúor 647), objetiva EC Plan-Neofluar de 20x, com escala de 0,312x0,312 µm por pixel, e incrementos de 1,5 µm e analisadas usando o software ZEN Blue 2.3 (para reconstrução 3D).

#### **4.6 Curva de Inibição do Crescimento para Tratamentos Selecionados Associado à Análise de MEV e de Expressão Gênica**

A fração AcOEt\_BRA/DF (250 µg/mL) apresentou atividade contra a formação inicial do biofilme (24h) e a molécula CsF (125 µg/mL) apresentou atividade contra o biofilme pré-formado (48h). Assim, eles foram testados em cultura planctônica para determinar a curva de inibição do crescimento de *S. mutans*, utilizando as culturas na fase *mid-log* de crescimento<sup>234</sup>.

##### **4.6.1 Curva de inibição do crescimento**

Em uma microplaca de poliestireno de 48 poços (Kasvi, Pequim, China) foi adicionada uma alíquota de 150 µL do inóculo de *S. mutans* (preparado conforme descrito no **item 4.2**) cada poço da placa continha os tratamentos nas concentrações a serem avaliadas. Foram preparados 2 poços contendo o inóculo e 1 poço sem o inóculo (controle para observação visual de crescimento bacteriano e para este, foi usado volume de 100 µL do poço). Uma alíquota do inóculo foi semeada para determinar a quantidade de UFC/mL no tempo 0 h (antes de iniciar a incubação e adicionar os tratamentos – controle do inóculo). Após a incubação pelos tempos determinados (1h, 2h, 4h, 6h e 24h; 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), foram realizadas a observação visual dos poços e a semeadura das culturas em placas de BHI ágar. Para tanto, uma alíquota 10 µL da cultura pura foi semeada em duplicata nas placas de BHI ágar e ainda, 40 µL foi retirado de cada poço e transferido para microtubos contendo 360 µL de NaCl a 0,89% (diluição 1:10 v/v), seguido de diluição seriada e semeadura em duplicata em placas de BHI ágar. As placas de BHI ágar foram incubadas (48h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) e após, foram realizadas as contagens de colônias e cálculo do número logarítmico (log) de UFC/mL correspondente a cada tratamento, comparado ao controle do veículo. Foram realizadas 2 ocasiões experimentais, em duplicata, para os tratamentos e controle testados (n=2). Para as análises de MEV, às 2h, 4h e 24h

foi retirada uma alíquota das culturas tratadas com AcOEt\_BRA/DF foi diluída 1:1 (v/v) em glutaraldeído 2,5%; o mesmo procedimento foi realizado para CsF às 4h e 24h e para o veículo às 24h. As amostras foram armazenadas em geladeira para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) como descrito a seguir.

#### **4.6.2 Preparo das culturas para análises de MEV**

As amostras diluídas (1:1 v/v) em glutaraldeído 2,5% foram centrifugadas (5 min, 15294 xg ou 12000 rpm, 4°C). Após, o sobrenadante foi descartado cuidando para não descolar o *pellet*. Aos *pellets*, adicionou-se 500 µL de EtOH 70% e as amostras foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas (5 min, 15294 xg ou 12000 rpm, 4°C) e o sobrenadante descartado. Aos *pellets*, adicionou-se 500 µL de EtOH 90% e as amostras foram incubadas por mais 1 h em temperatura ambiente. Após, foram centrifugadas (5 min, 15294 xg ou 12000 rpm, 4°C) e o sobrenadante descartado. Então, ressuspendeu-se os *pellets* em 10 µL de EtOH absoluto e este volume foi transferido para lamínulas limpas posicionadas no fundo de poços de uma placa de 24 poços. Após a evaporação completa do EtOH absoluto, a placa foi mantida em dessecador de sílica a vácuo até o momento das análises. As amostras foram recobertas por carbono e as imagens foram obtidas através do microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG; JEOL, modelo JSM-7500F) com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS; Thermo Scientific, modelo Ultra Dry) com software de operação NSS 2.3. Foram adquiridas imagens em diferentes ampliações (1000 x, 3500 x e 6500 x).

#### **4.6.3 Inibição do crescimento por compostos distintos para análise de expressão gênica (genes selecionados)**

Para explicar a diferença no perfil de sobrevivência entre os compostos, células planctônicas de *S. mutans* foram tratadas com diferentes agentes com alvos reconhecidos para saber os possíveis alvos envolvidos na atividade observada (Quadro 8). Os agentes e suas concentrações se basearam em dados anteriores<sup>195,226,234</sup>. A concentração de CHX (0,12%) foi a mesma de colutórios bucais comercializados para o controle de biofilmes e a de flúor (250 ppm) é a mais encontrada em colutórios bucais<sup>235</sup>. Preparou-se pré-inóculo como descrito acima e

para o inóculo, utilizou-se 2 tubos Falcon de 50 mL para diluir o pé-inóculo (1:20) usando 2 mL do pré-inóculo + 38 mL TY+1% glicose. Atingida a DO adequada, a cultura foi centrifugada (3220 xg ou 4000 rpm, 4°C, 20 min) e o sobrenadante descartado. Após, ressuspendeu-se o *pellet* com metade do volume inicial de TY+1% glicose. Este volume foi dividido em 12 tubos e os tratamentos foram adicionados seguido por incubação; contudo, o tempo foi diferente com base na curva de sobrevivência (Quadro 9). Após a incubação pelo tempo descrito, uma alíquota foi removida para semeadura (para confirmar a redução da viabilidade celular; dados apresentados no Quadro 1 em Apêndice B). Os tubos foram incubados em gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3220 xg ou 4000 rpm, 4°C, 20 min), o sobrenadante de cada uma foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de RNAlater (Ambion, Invitrogen, catálogo #AM7020). As amostras foram congeladas a -80 °C até o isolamento do RNA.

**Quadro 8 - Agentes de tratamento utilizados**

| Agente de tratamento       | Composto químico  | Mecanismo de Ação  | Referência  | Informações adicionais                       | Grau de pureza        |
|----------------------------|---|--|---|--|-----------------------|
| Composto 1771              | (5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbamoyl]methyl 2-{naphtho[2,1-b]furan-1-yl}acetate                   | Molécula sintética com alvo a LTA sintase; afeta a composição da parede celular de espécies Gram-positivas (metabolismo de ácidos lipoteicóicos) | Paganelli et al. <sup>236</sup> ; Richter et al. <sup>237</sup> | UkrOrgSynthesis Ltd.; Cat.#PB25353228        | Pureza não disponível |
| Hidroxichalcona 4' (C135)  | (2E)-1-(4-hydroxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one  | Intermediário metabólico para a síntese de flavonoides; afeta a atividade de Gtfs  | Nijampatnam et al. <sup>198</sup>                               | AK Scientific, Inc.; Cat.#C135               | 98% de pureza         |
| Miricetina (J10595)        | 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one  | Flavonoide; afeta a atividade de Gtfs, a glicólise, a atividade F-ATPase e inibe a síntese de EPS  | Falsetta et al. <sup>197</sup>                                  | AK Scientific, Inc.; Cat.#J10595             | 95% de pureza         |
| <i>tt</i> -farnesol        | [(E,E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol, trans,trans-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol | Terpeno; afeta a tolerância aos ácidos, tem a membrana celular como alvo   | Koo et al. <sup>183</sup>                                       | Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO; Cat.# 46193 | 96% de pureza         |
| Fluoreto de sódio ou flúor | Fluoreto de sódio   | Promove a remineralização dentária e retarda o crescimento bacteriano por inibir a enzima enolase (via glicolítica)                              | Ten Cate <sup>79</sup> ; Ten Cate & Buzalaf <sup>110</sup>      | Sigma-Aldrich; Cat.# 71519                   | 99% de pureza         |
| Digluconato de clorexidina | 1,1'-Hexamethylenebis[5-(4-chlorophenyl)biguanide]  | Bisguanidina (catiônica) Afeta a membrana celular, suprime o nível de estreptococos do grupo mutans na saliva                                    | Mattos Graner et al. <sup>15</sup>                              | Sigma-Aldrich; Cat.# 282227                  | 99,5% de pureza       |

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 9** - Agentes de tratamento utilizados e os respectivos incubação foi diferente com base na curva de sobrevivência

|   | Volume ( $\mu\text{L}$ ) |                      |                      |                      |                      |                        |                      |         |         |
|---|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|---------|---------|
|   | CHX                      | C135                 | AcOEt_BRA/DF         | <i>tt</i> -farnesol  | CsF                  | 1771                   | J10595               | Flúor   | V       |
| Concentração do composto  | 0,12%                    | 250 $\mu\text{g/mL}$ | 250 $\mu\text{g/mL}$ | 125 $\mu\text{g/mL}$ | 125 $\mu\text{g/mL}$ | 7,812 $\mu\text{g/mL}$ | 500 $\mu\text{g/mL}$ | 250 ppm | 0 (V)   |
| Volume do estoque 2 mg/mL 1771, 1 mg/mL CsF, 2 mg/mL AcOEt e 15 mg/mL outros em 84,15% EtOH + 15% DMSO. Flúor 5000 ppm. CHX 20% | 9,00                     | 25,05                | 187,49               | 12,53                | 187,49               | 5,85                   | 50,03                | 75,00   | 0,00    |
| Volume veículo (V) – 42,075% EtOH + 7,5% DMSO ( $\mu\text{L}$ ) + 50% tampão fosfato pH 6                                       | 187,49                   | 137,39               | 0,00                 | 162,42               | 0,00                 | 175,79                 | 87,43                | 187,49  | 187,49  |
| Volume de meio de cultura ( $\mu\text{L}$ )   | 1303,51                  | 1337,56              | 1312,51              | 1325,06              | 1312,51              | 1318,36                | 1362,54              | 1237,51 | 1312,51 |
| Volume total por tubo   | 1500                     | 1500                 | 1500                 | 1500                 | 1500                 | 1500                   | 1500                 | 1500    | 1500    |
| Tempo de incubação  | 10 min                   | 10 min               | 1 h                  | 1 hora               | 4 h                  | 6 h                    | 6 h                  | 6 h     | -       |

EtOH: Etanol; DMSO: dimetilsulfóxido; CHX: clorexidina; CsF Caseargrewiina F. Havia o controle veículo para cada tempo de incubação com os compostos específicos.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.6.4 Expressão gênica de *S. mutans*

A metodologia RT-qPCR (*Reverse Transcription – quantitative Polymerase chain reaction*) incluiu, além do isolamento do RNA, a síntese de cDNA e a análise da expressão gênica via qPCR dos genes selecionados. Foram selecionados 5 genes específicos para análise do perfil de expressão: genes associados com o metabolismo de EPS (*gtfB*, síntese de glucanos insolúveis) e eDNA (*IrgA*), a tolerância ao estresse ácido (*atpD*) e aos estresses ácido e oxidativo (*nox1*), com a glicólise (*eno*, enzima enolase, alvo de fluoreto)<sup>5,238</sup>.

Uma metodologia otimizada para *S. mutans* foi utilizada para isolar o RNA pelo método de separação fenol-clorofórmio (usando capela de exaustão), e a purificação através do tratamento com DNase em coluna (Rneasy Micro Kit, Qiagen) e em solução (TURBO DNase; Ambion)<sup>239</sup>. A DNase foi removida usando o Rneasy MinElute clean-up kit (Qiagen). Após, foi utilizada espectrofotometria para avaliar a quantidade ( $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ -  $\text{DO}_{260\text{nm}}$ ) e a pureza (razão  $\text{DO}_{260/280}$ ) das amostras de RNA (Nano-espectrofotômetro DS-11+, Denovix). O rendimento foi calculado dependendo do volume em que foi diluído o RNA. A integridade do RNA purificado foi verificada por eletroforese de gel de agarose 1% (Ultra Pure Invitrogen; Figura 1 em Apêndice C). As informações de leituras das etapas de purificação do RNA estão descritas nos Quadros 1 a 3 em Apêndice C. Não houve rendimento adequado de RNA para a cultura tratada com CHX, sendo esta amostra excluída das análises.

##### 4.6.4.1 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher; catalogo #4368814). Para isso, 0,25  $\mu\text{g}$  de RNA total (1,25  $\mu\text{L}$  de RNA a 200  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ , Quadro 4 em Apêndice C) foi misturado com 2  $\mu\text{L}$  do tampão 10x RT Buffer, 1  $\mu\text{L}$  da enzima transcriptase Reversa (MultiScribe™ Reverse Transcriptase), 0,8  $\mu\text{L}$  de 25X dNTP mix (100 mM), 2  $\mu\text{L}$  de 10X RT Random Primers, 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase (Rnase Inhibitor) e 11,95  $\mu\text{L}$  de água de grau molecular para completar 20  $\mu\text{L}$  (i.e., amostras RT+). Reações contendo todos os reagentes do kit exceto a enzima transcriptase reversa e RNA serviram de controles negativos, determinando se havia contaminação com DNA (amostras RT-). As reações foram incubadas usando o termociclador CFX96 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos), usando o protocolo determinado pelo fabricante, seguindo o ciclo: 10 min/25 °C, 120 min/37 °C, 5 min/85°C,  $\infty/4$  °C. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até sua diluição (1:5 e 1:1.000) e uso para a quantificação da expressão gênica. As diluições de cDNA também foram armazenadas em freezer -20 °C.

#### 4.6.4.2 Quantificação da expressão gênica via qPCR

Foi utilizado +RT cDNA diluído a 1:5 para detectar os genes de interesse, enquanto a diluição 1:1.000 foi usada para o gene *16S rRNA*, gene selecionado como normalizador de expressão de genes específicos<sup>240</sup>. O cDNA foi amplificado com *primers* específicos (Quadro 10), seguindo protocolos determinados anteriormente<sup>61,232,233,238</sup>. Para isso, foi adicionado 0,5 µL de cDNA, a um volume determinado do *primer* específico (10 µM) de acordo com a sua concentração ótima para o gene selecionado, 12,5 µL de 2X SYBR PowerUp Green Master Mix (Thermo Fisher; catálogo #A25776) e volume em µL de água de grau molecular, completando 25 µL. Para cada gene foi incluída uma curva padrão baseada no produto de PCR purificado do gene alvo<sup>241</sup>.

**Quadro 10** - Primers utilizados para avaliar expressão gênica

| GenBank Locus Tag | Nome do gene | Sequências dos primers ( <i>forward e reverse</i> ) | Concentração ótima do primer (nM) | Tamanho do produto de PCR (pb) | Referência                             |
|-------------------|--------------|---|-----------------------------------|--------------------------------|--|
|                   | 16 S rRNA    | ACCAGAAAGGGACGGCTAAC<br>TAGCCTTTTACTCCAGACTTTCCTG   | 200                               | 122                            | Xiao et al. <sup>9</sup>               |
| SMU_1004          | <i>gtfB</i>  | AAACAACCGAAGCTGATAC<br>CAATTTCTTTTACATTGGAAG        | 250                               | 90                             |  |
| SMU_765           | <i>nox1</i>  | GGACAAGAATCTGGTGTGGA<br>CAATATCAGTCTCTACCTTAGGC     | 250                               | 91                             | Klein et al. <sup>242</sup>            |
| SMU_1528 c        | <i>atpD</i>  | GCGACAAGTCTCAAAGAATTG<br>AACCATCAGTTGACTCCATAGC     | 250                               | 115                            |  |
| SMU_1247          | <i>eno</i>   | GTTGAACTTCGCGATGGAGAT<br>GTCAAGTGCGATCATTGCTTTAT    | 250                               | 150                            | Lopes et al. <sup>234</sup>            |
| SMU_575c          | <i>IrgA</i>  | GTCTATCTATGCTGCTATT<br>AAGGACATACATGAGAAC           | 300                               | 109                            | Florez Salamanca & Klein <sup>53</sup> |

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, a placa foi centrifugada (4000 rpm; 1 min; 4°C; centrífuga 5430R, Eppendorf) e após, as reações foram incubadas no termociclador CFX96, seguindo o seguinte ciclo de amplificação: 2 min/ 50 °C; 2 min/95 °C; 39 vezes: 0:15 min/95 °C; 0:30 min/ 58 °C e 1 min/72 °C; 0:15 min/95 °C; Melt Curve 60.0°C to 95.0°C: Increment 0.5°C 0:05. Ao final, foi observada a curva padrão baseada no produto de PCR, com R<sup>2</sup> o mais próximo de 1, eficiência de reação de 90 – 100% e inclinação de aproximadamente -3,3. Foi observado que para os genes *gtfB* e *IrgA*, a amplificação foi inadequada usando o SYBR Thermo e então, a reação foi realizada com o SYBR, Biorad e seu ciclo. Essa amplificação foi adequada, conforme as diretrizes MIQE<sup>246</sup>.

#### 4.7 Caracterização Química das Frações de *C. sylvestris*

As análises cromatográficas utilizaram um UHPLC-DAD (Ultimate 3000 RS, Dionex) equipado com degaseificador, bomba quaternária, amostrador automático, detector de matriz de fotodiodos UV e forno, seguindo a metodologia de Bueno et al.<sup>22</sup>. Resumidamente, a separação foi realizada usando uma coluna analítica C18 (Phenomenex Kinetex 150 × 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å) protegida por uma pré-coluna compatível. As condições cromatográficas foram: vazão de 400 µL/min, temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 2 µL. A fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B) usando o seguinte gradiente linear de eluição: 10–25% B de 0 a 15 min, 25–90% B em 35 min, mantendo 90% B até 40 min e retornando às condições iniciais, 10% B durante 2 min, e mantendo por mais 3 min para acondicionamento da coluna. Dados espectrais de absorção foram coletados em 45 min de 200 a 800 nm.

#### 4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos para cada etapa foram submetidos à análise estatística descritiva (organizados em banco de dados - Excel) e para obter melhor precisão na estimativa do efeito dos tratamentos, foi realizado o cálculo do intervalo de confiança (IC95%) da estimativa para comparação dos tratamentos *versus* o veículo diluente. Para tanto, os dados foram analisados pelo software estatístico Prism 8 (GraphPad Software).

Assim, através da construção do intervalo de confiança (IC95%): I) Os dados para atividade antimicrobiana (cultura planctônica) e antibiofilme foram analisados comparando os grupos avaliados com o controle veículo (variável independente) como contagem de UFC/mL (variável dependente) para comparação da eficácia dos tratamentos testados com o controle veículo; II) Os dados da caracterização dos biofilmes após breve exposição incluíram as variáveis resposta: biomassa (mg), proteínas (µg), população (UFC/biofilme), componentes da matriz extracelular [ASP (µg), WSP (µg), proteínas (µg) e eDNA (ng)], III) os dados para curva de inibição de crescimento foram analisados comparando os grupos avaliados com o controle veículo (variável independente) longitudinalmente como contagem de UFC/mL (variável dependente) e IV) Os dados de expressão gênica (mudança de magnitude) foram analisados comparando os grupos avaliados com o controle veículo.

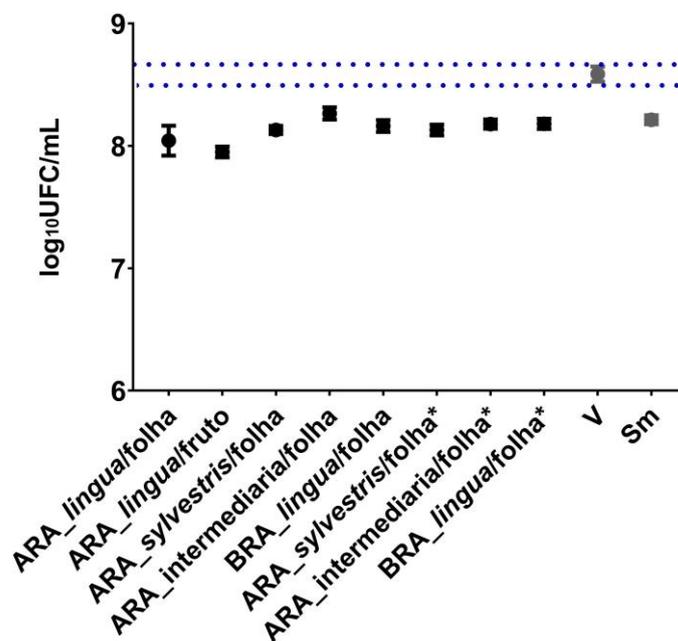
## 5 RESULTADO

Os resultados obtidos neste trabalho estão descritos detalhadamente a seguir.

### 5.1 Atividade Antimicrobiana (Cultura Planctônica) dos Extratos Brutos

Os dados de UFC/mL obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana foram convertidos para  $\log_{10}$  para verificar a redução em log. A medida foi considerada efetiva quando a contagem de UFC/mL foi reduzida em 3 logs (vs. veículo ou controle diluente)<sup>243,244</sup>. Os extratos causaram reduções médias de 0,5 logs vs. o controle veículo (Figura 13), portanto, nenhum inibiu >3 logs das contagens de células viáveis. Assim, efeito observado não é biologicamente significativo<sup>245</sup>. Esses dados são diferentes daqueles obtidos anteriormente<sup>23</sup>, quando ocorreu redução adequada. Isso demonstra a necessidade da testagem de todos os lotes de extratos.

**Figura 13** - Atividade antimicrobiana dos extratos de *C. sylvestris* contra *S. mutans*



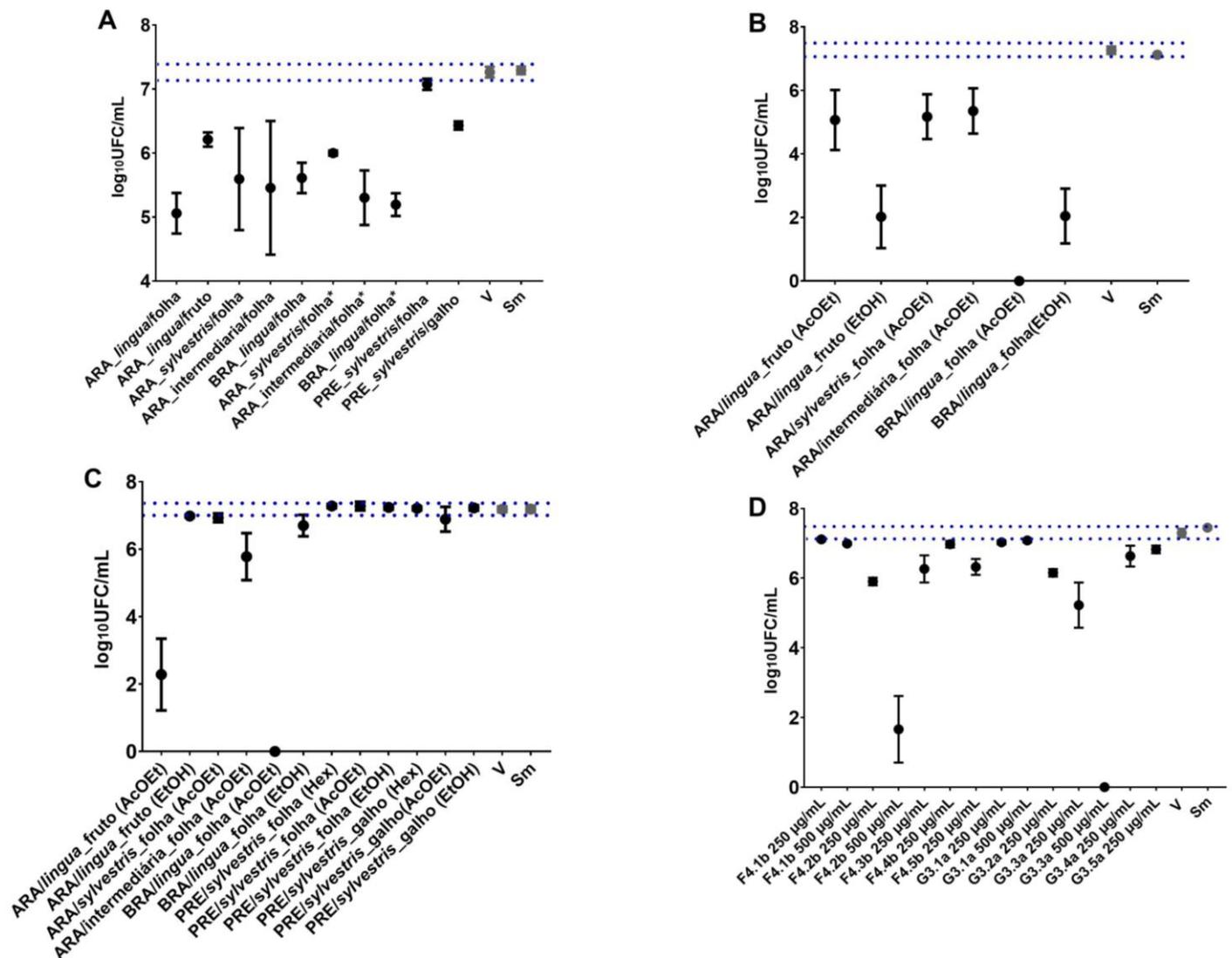
Dados de  $\log_{10}$ UFC de células planctônicas tratadas pelos extratos brutos. O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O pontilhado em azul usa dos dados de veículo como referência para comparação da eficácia dos tratamentos testados. O controle de crescimento (sem tratamento) é representado como Sm para *S. mutans* e V para o controle veículo (sendo a concentração em cada poço 1,75% EtOH e 0,31% DMSO). O asterisco indica os extratos brutos com o pH ajustado para o valor próximo ao do veículo. Os experimentos foram realizados em triplicata em duas ocasiões distintas (n=2).

Fonte: Elaboração própria.

## 5.2 Atividade Antibiofilme (Modelo de Longa Exposição - 24h)

Os dados de UFC/mL obtidos nos ensaios antibiofilme foram convertidos para  $\log_{10}$  para verificar a redução em log. A medida foi considerada efetiva quando a contagem de UFC/mL foi reduzida em 3 logs (vs. veículo ou controle diluente) para biofilmes de 24h e 48h<sup>243,244</sup>. Em biofilmes iniciais (24h), nenhum extrato inibiu  $\geq 3$  logs das contagens de células viáveis (Figura 14 A). Portanto, para estas amostras, não se considera uma atividade biológica promissora. Para as frações avaliadas em biofilmes iniciais (incubação dos agentes com as células desde o início da formação dos biofilmes até a análise após 24h), nenhuma fração Hex reduziu a população dos biofilmes tratados, este dado corrobora com nossos achados anteriores<sup>23</sup> (Quadros 1 e 2 em Apêndice D). Todas as frações obtidas através da metodologia 1 reduziram a contagem da população viável de *S. mutans*. Contudo, reduções consideráveis foram obtidas para as frações AcOEt e EtOH de BRA/DF, que reduziram em média, respectivamente, 8 e 6 logs das contagens de células viáveis (vs. veículo; Figura 14 B). Para as frações obtidas pela metodologia 2, AcOEt\_BRA/DF reduziu em média 8 logs da contagem de células viáveis (vs.veículo; Figura 14 C). Outra tentativa de caracterização da fração ativa foi feita através do fracionamento de extratos de folhas (F) e galhos (G) de *C. sylvestris* coletados em Presidente Venceslau (PRE) pela EFS-C18. As frações Água/EtOH 60:40 (F4.2b) e Água/EtOH 40:60 (G3.3a), ambas a 500  $\mu\text{g/mL}$ , reduziram em média, respectivamente, 6 e 8 logs da contagem de células viáveis dos biofilmes (vs. veículo; Figura 14 D).

**Figura 14** - Atividade de extratos brutos e frações de *C. sylvestris* contra a formação biofilmes de 24h

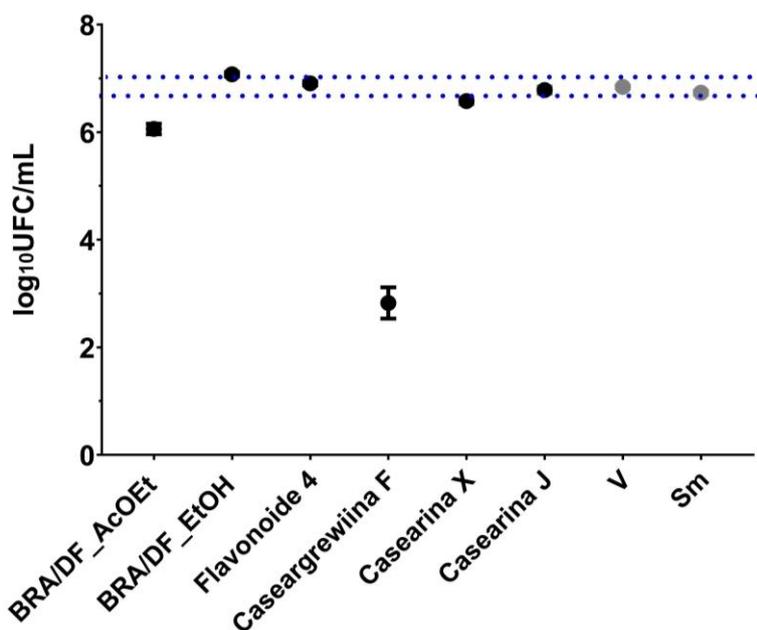


Os gráficos mostram em **A**, log<sub>10</sub>UFC dos biofilmes tratados pelos extratos brutos; **B**, log<sub>10</sub>UFC dos biofilmes tratados por frações secas em concentrador de amostra; **C**, log<sub>10</sub>UFC dos biofilmes tratados por frações secas na capela de exaustão; **D**, log<sub>10</sub>UFC dos biofilmes tratados pelas frações EFS-C18 de PRE/SP. O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O pontilhado em azul usa dos dados de veículo como referência para comparação da eficácia dos tratamentos testados. O controle de crescimento (sem tratamento) é representado como Sm para *S. mutans* e V para o controle veículo (sendo a concentração em cada poço 1,75% EtOH e 0,31% DMSO para os extratos brutos, enquanto para as frações AcOEt, EtOH e Hex foi 5,26% EtOH e 0,94% DMSO e para as frações EFS-C18, 2,63% EtOH). O asterisco indica os extratos brutos com o pH ajustado para o valor próximo ao do veículo. Os experimentos foram realizados em triplicata em duas ocasiões distintas (n=2).

Fonte: Elaboração própria.

Em relação aos biofilmes pré-formados, entre as moléculas isoladas avaliadas neste modelo, apenas CsF (125 µg/mL) reduziu a contagem de células viáveis dos biofilmes pré-formados vs. veículo (reduziu 5 logs; Figura 15). No entanto, para este modelo de biofilme, as frações AcOEt e EtOH (500 µg/mL) de Brasília/DF, não reduziram a viabilidade celular.

**Figura 15** - Atividade de frações e moléculas de *C. sylvestris* contra a formação biofilmes de 48h



Log<sub>10</sub>UFC dos biofilmes tratados por frações, flavonoide e casearinas. O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O pontilhado em azul usa dos dados de veículo como referência para comparação da eficácia dos tratamentos testados. O controle de crescimento (sem tratamento) é representado como Sm para *S. mutans* e V para o controle veículo (sendo a concentração em cada poço 5,26% EtOH e 0,94% DMSO). Os experimentos foram realizados em triplicata em duas ocasiões distintas (n=2).

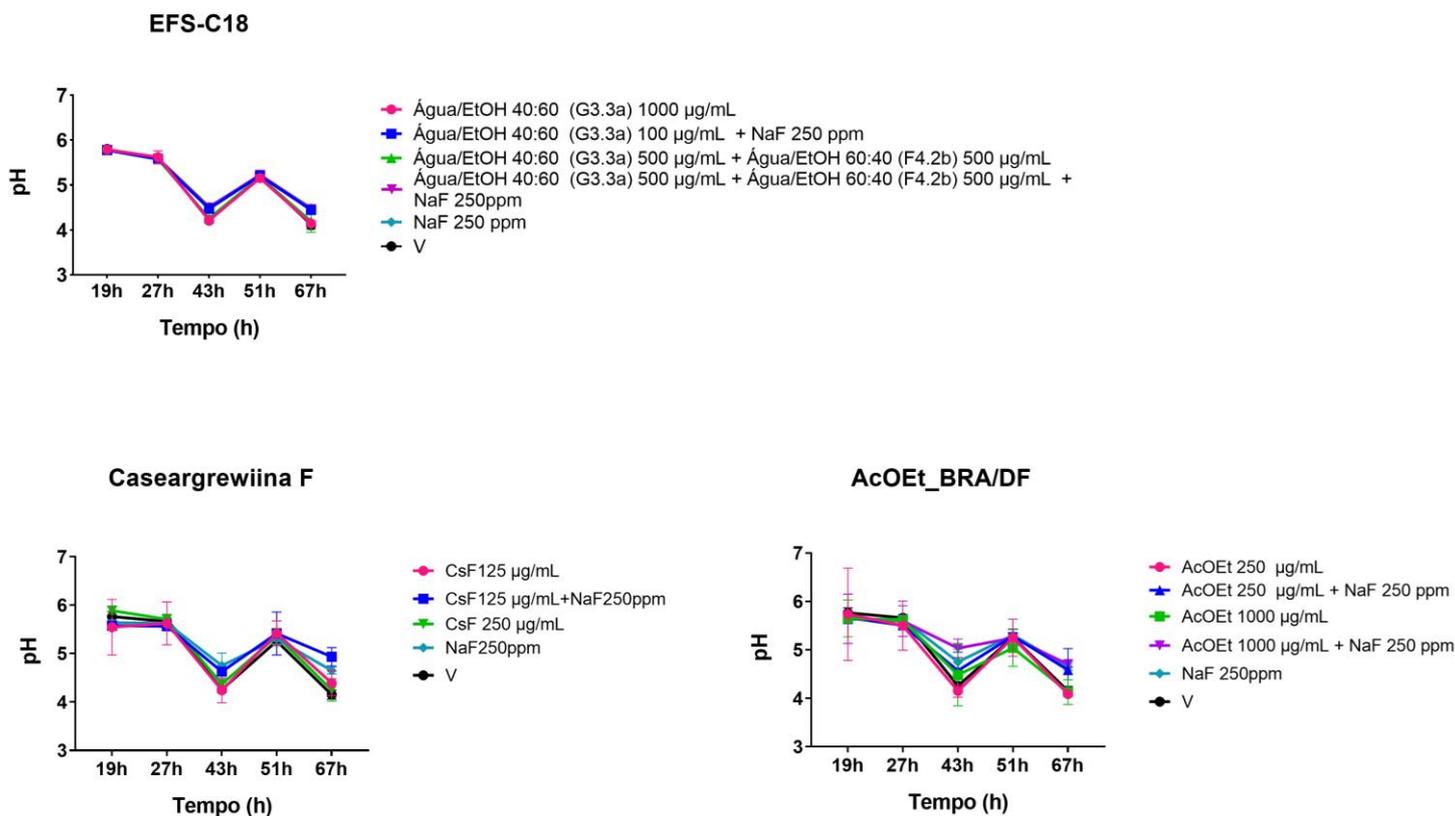
Fonte: Elaboração própria.

### 5.3 Efeito de Tratamentos Tópicos em Biofilmes Cultivados em Discos de sHA (Exposição Breve)

Os dados obtidos para de tratamentos tópicos em biofilmes cultivados em discos de sHA (população viável, biomassa, componentes da matriz extracelular e organização estrutural) são detalhados a seguir.

#### 5.3.1 pH do meio de cultura

Os dados de pH estão representados pela Figura 16. Os valores refletem a acidogenicidade (medida da concentração de íons de hidrogênio livres no meio). Entretanto, não mostram se ocorreu concentração de ácido em algum local específico dentro do biofilme ou na interface biofilme e o substrato (disco de HA). Os valores médios de pH para as idades de 43, 51 e 67h são mais ácidos quando comparados com 19h e estão abaixo de 5,5; valor de pH considerado crítico para a desmineralização do esmalte dentário. No entanto, de forma geral, observa-se uma similaridade nos valores de pH, entre os grupos avaliados, ao longo do tempo, embora as soluções com fluoreto apresentem valores mais elevados.

**Figura 16 - pH dos meios de cultura dos biofilmes em fases distintas de desenvolvimento**

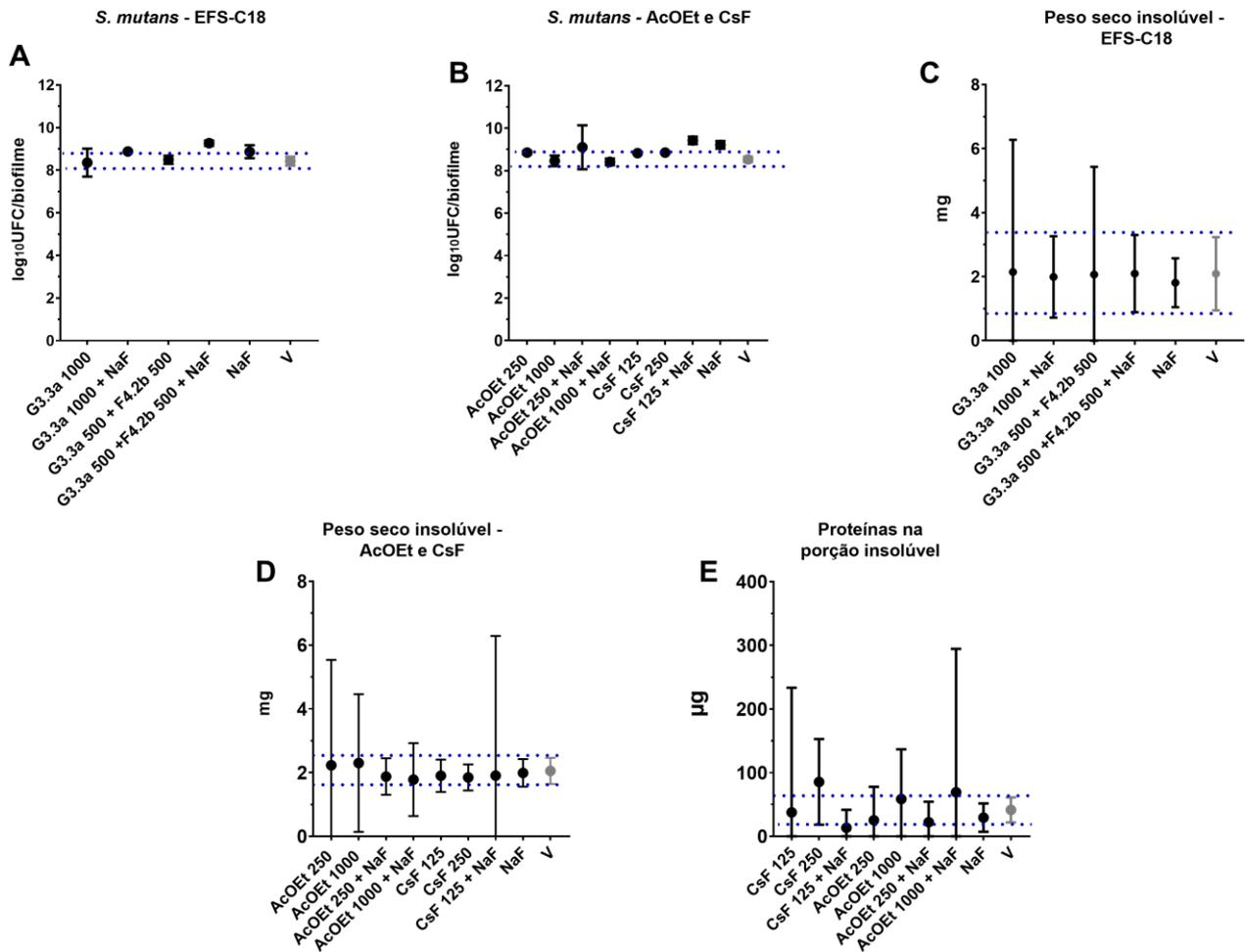
Dados de pH do meio de cultura do biofilme em desenvolvimento, em 19, 27, 43, 51 e 67h, para cada tratamento e controles avaliados. O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O controle veículo é representado como V (sendo a concentração 10,52% EtOH para as frações EFS-C18; 21,04% EtOH e 3,75% DMSO para as frações AcOEt\_BRA/DF e 10,52% EtOH e 1,87% DMSO para CsF). Os experimentos para soluções EFS-C18, AcOEt\_BRA/DF e CsF 125 µg/mL foram realizados em duplicata em uma ocasião experimental (n=1) e em duplicata em duas ocasiões distintas (n=2) para CsF 250 µg/mL.

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3.2 População microbiana, peso seco do biofilme (peso seco insolúvel) e proteínas do biofilme (porção insolúvel)

Todos os grupos foram comparados com o controle veículo. A exposição tópica (1,5 min para frações EFS-C18 e 10 min para AcOEt\_BRA/DF e CsF) apresentou efeito apenas na população bacteriana, com aumento da mesma para Água/EtOH 40:60 (G3.3a) 1000 µg/mL + NaF 250 ppm, Água/EtOH 40:60 (G3.3a) 500 µg/mL + Água/EtOH 60:40 (F4.2b) 500 µg/mL + NaF 250 ppm (Figura 17 A) e nas menores concentrações testadas para a fração AcOEt\_BRA/DF 250 µg/mL e CsF 125 µg/mL combinadas com NaF (Figura 17 B); isso também ocorreu para o controle NaF vs. o veículo (Figura 17 A e 17 B). Não ocorreu efeito pronunciado no peso seco insolúvel (Figuras 17 C e 17 D) e proteínas da porção insolúvel (Figura 17 E).

**Figura 17 - Caracterização de biofilmes após tratamentos tópicos**



Os gráficos mostram em **A.** População microbiana (log<sub>10</sub>UFC/biofilme) das frações EFS-C18; **B.** População microbiana (log<sub>10</sub>UFC/biofilme) das frações BRA/DF\_AcOEt e CsF; **C.** Peso seco (mg) das frações EFS-C18; **D.** Peso seco (mg) das frações BRA/DF\_AcOEt e CsF e **E.** Proteínas insolúveis dos biofilmes formados pós-tratamento com os agentes e controles selecionados. O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O pontilhado em azul usa dos dados de veículo como referência para comparação da eficácia dos tratamentos testados. O controle veículo é representado como V (sendo a concentração 10,52% EtOH para as frações EFS-C18; 21,04% EtOH e 3,75% DMSO para as frações AcOEt\_BRA/DF e 10,52% EtOH e 1,87% DMSO para CsF). Os experimentos para soluções EFS-C18, AcOEt\_BRA/DF e CsF 125 µg/mL foram realizados em duplicata em uma ocasião experimental (n=1) e em duplicata em duas ocasiões distintas (n=2) para CsF 250 µg/mL.

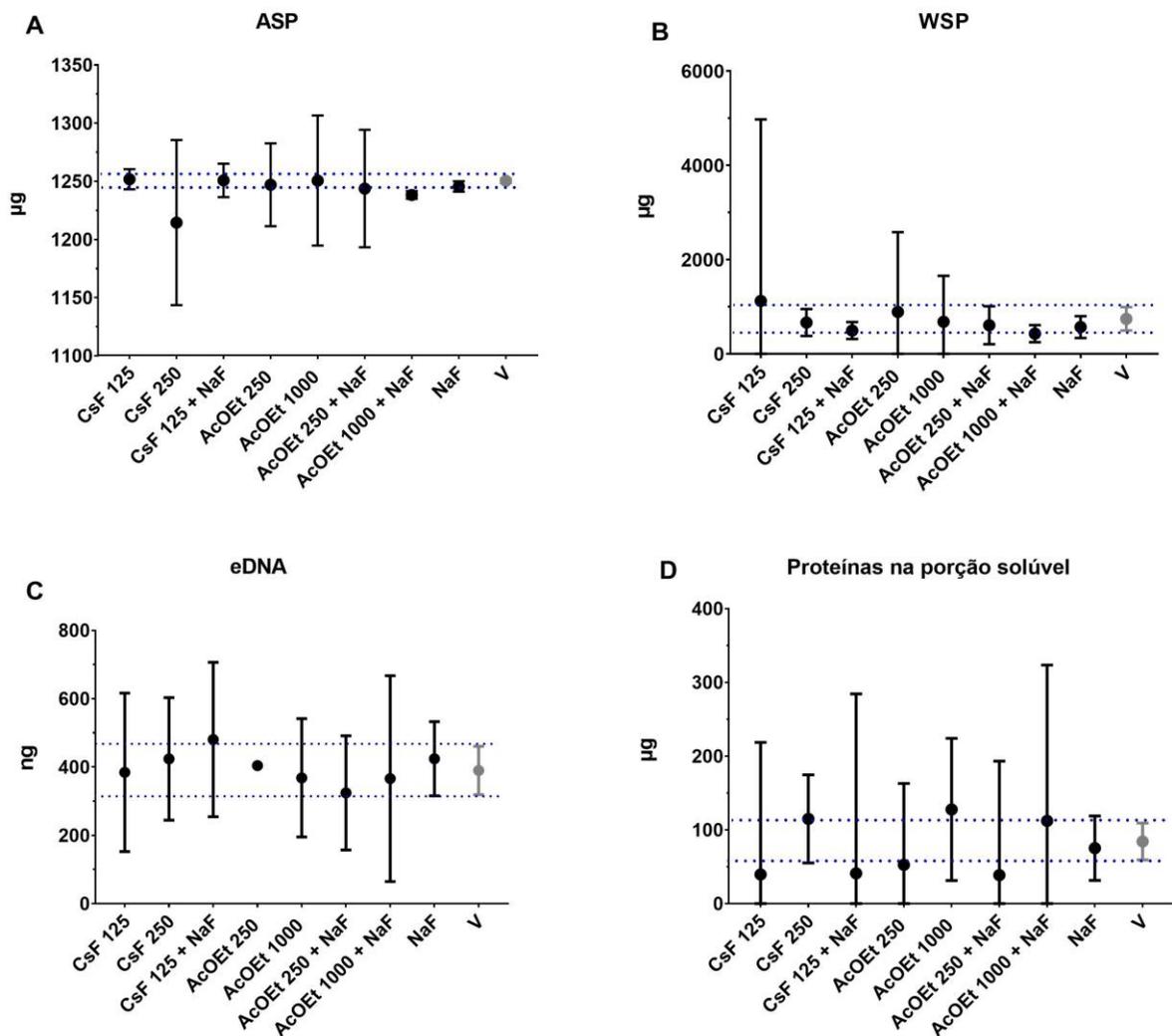
Fonte: Elaboração própria.

### 5.3.3 Componentes da matriz extracelular dos biofilmes

A quantidade de exopolissacarídeos insolúveis (ASP – recuperados na porção insolúvel da matriz dos biofilmes) e solúveis (WSP – recuperados na porção solúvel da matriz dos biofilmes), eDNA e proteínas da porção solúvel do biofilme estão representados na Figura 18. Não ocorreu efeito pronunciado para estes componentes da matriz

extracelular. Os dados indicam que o efeito antibiofilme encontrado no modelo em fundo de placa pode ter sido principalmente pela exposição prolongada (24h de exposição durante a formação inicial do biofilme ou após a formação inicial) e tal efeito pode ser majoritariamente devido à ação antibacteriana (morte celular – vide dados do item 5.4 Curva de inibição do crescimento de CsF e AcOEt\_BRA/DF).

**Figura 18** - Componentes da matriz extracelular dos biofilmes



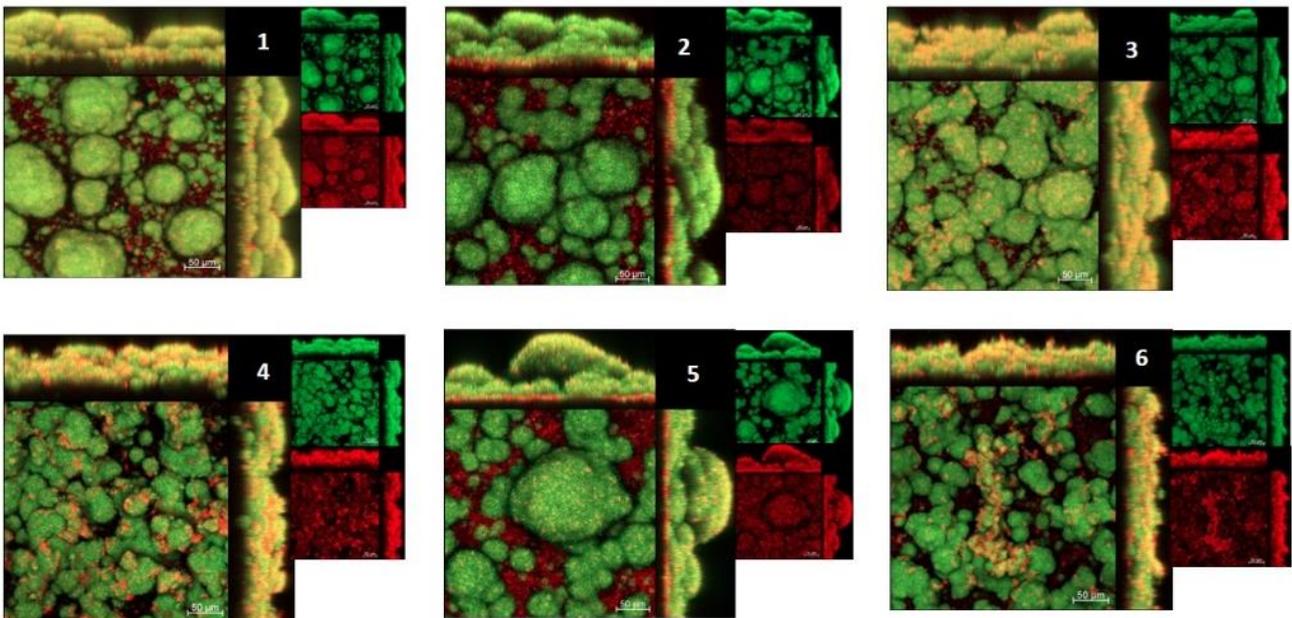
Os gráficos mostram a quantificação de **A.** ASP (µg); **B.** WSP (µg); **C.** eDNA (ng) e **D.** proteínas da porção solúvel dos biofilmes formados pós-tratamento com os agentes e controles selecionados. O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O pontilhado em azul usa dos dados de veículo como referência para comparação da eficácia dos tratamentos testados. O controle veículo é representado como V (sendo a concentração 21,04% EtOH e 3,75% DMSO para as frações AcOEt\_BRA/DF e 10,52% EtOH e 1,87% DMSO para CsF). Os experimentos para AcOEt\_BRA/DF e CsF 125 µg/mL foram realizados em duplicata em uma ocasião experimental (n=1) e para CsF 250 µg/mL foram realizados em duplicata em duas ocasiões distintas (n=2).

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3.4 Estrutura tridimensional de biofilmes usando microscopia confocal

Imagens representativas da estrutura tridimensional (3D) de biofilmes são mostradas na Figura 19. Os biofilmes tratados com o veículo apresentaram aglomerações de grandes microcolônias bem definidas protegidas pelo EPS na matriz extracelular. Os demais tratamentos (isolados ou em combinação entre si e/ou com NaF) apresentaram arquitetura semelhante, com microcolônias grandes espalhadas na superfície do disco. Por fim, os biofilmes tratados com flúor (NaF) apresentaram aglomerações de microcolônias semelhantes aos biofilmes tratados com veículo. Portanto, os tratamentos não interferiram na organização tridimensional associada à virulência do biofilme.

**Figura 19** - Estrutura 3D do biofilme de *S. mutans*



Imagens confocal representativas de biofilmes de 67h são exibidas nesta imagem. A cor vermelha representa os exopolissacarídeos produzidos por *S. mutans* (Alexa Fluor 647) e a cor verde as células de *S. mutans* (SYTO 9). A imagem maior em cada conjunto representa as imagens sobrepostas dos canais vermelho e verde menor (barras de escala de 50  $\mu\text{m}$ ), que são mostradas separadamente em tamanho menor. 1. Água/EtOH 40:60 (G3.3a) – 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; 2. Água/EtOH 40:60 (G3.3a) – 1000  $\mu\text{g/mL}$  + NaF 250 ppm; 3. Água/EtOH 60:40 (F4.2b) – 500  $\mu\text{g/mL}$  + Água/EtOH 40:60 (G3.3a) – 500  $\mu\text{g/mL}$ ; 4. Água/EtOH 60:40 (F4.2b) – 500  $\mu\text{g/mL}$  + Água/EtOH 40:60 (G3.3a) – 500  $\mu\text{g/mL}$  + NaF 250ppm; 5. NaF 250ppm; 6. Veículo (10,52% EtOH).

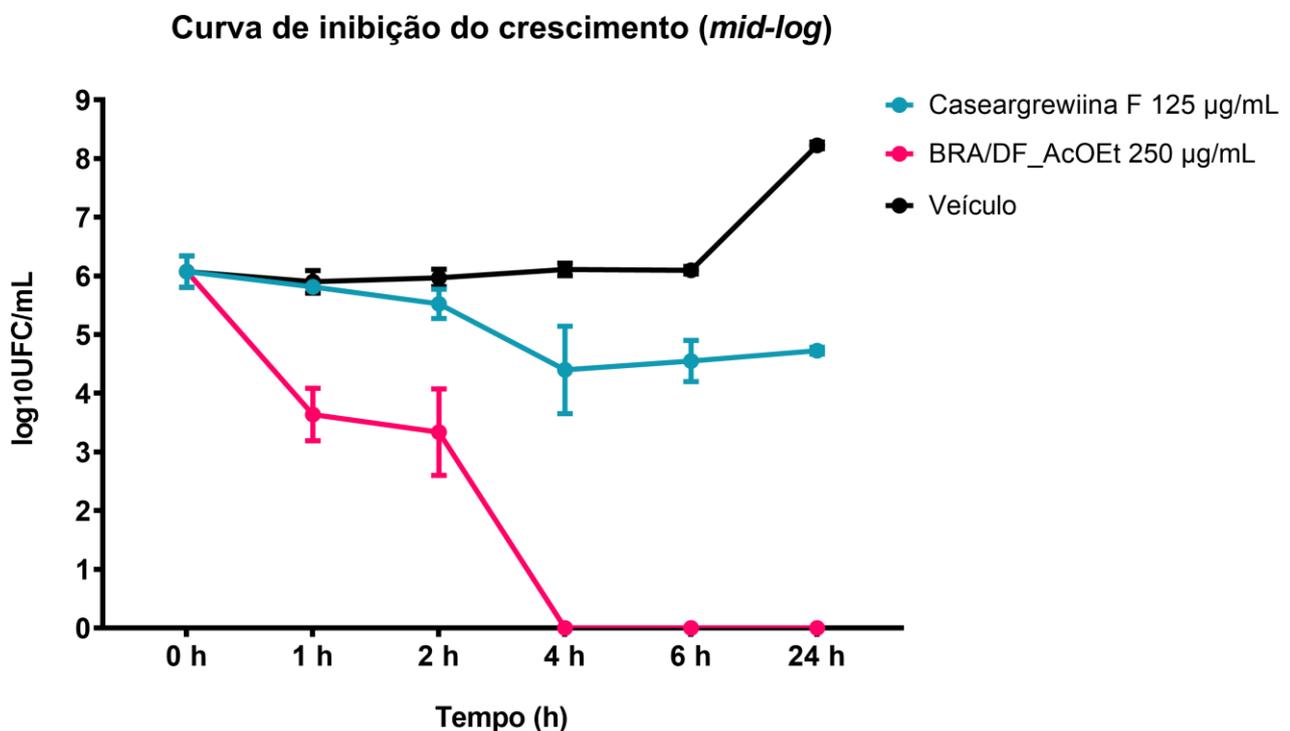
Fonte: Elaboração própria.

### 5.4 Curva de Inibição do Crescimento de CsF e AcOEt\_BRA/DF

Os dados obtidos para a realização da curva de inibição do crescimento em cultura planctônica estão representados na Figura 20. O efeito de AcOEt 250  $\mu\text{g/mL}$  é mais pronunciado (eficaz em matar *S. mutans*), com morte bacteriana significativa após 1h de

exposição (média de 2 logs vs. o veículo), com eliminação completa da bactéria em 4h até 24h de exposição. Esse efeito de AcOEt 250 µg/mL pode ser devido à sua composição (que será confirmada através da caracterização química; análise em andamento) ou até mesmo a concentração usada. É importante ressaltar que AcOEt 250 µg/mL resultou em 1 log a menos da população bacteriana vs. o veículo em biofilme de 48h (biofilme pré-formado) e eliminação completa da bactéria em biofilme inicial de 24h. Entretanto, ocorreu morte gradativa a partir de 1 hora para CsF 125 µg/mL e em 4h a redução média em relação ao controle veículo é de 1,71 logs. A recuperação média de colônias (células) sobreviventes para CsF ficou constante de 4 a 24h, sendo a diferença média em 24h de 3,5 logs em relação ao controle. Esses dados mostram que o efeito de CsF é bacteriostático enquanto o de AcOEt é bacteriocida. Desta forma, ambos CsF e AcOEt precisam estar em contato com as células de *S. mutans* por um tempo muito maior do que aquele utilizado nas aplicações tópicas (experimentalmente neste estudo e recomendado para formulações para controle químico de biofilmes orais).

**Figura 20** - Curva de inibição do crescimento em cultura planctônica de *S. mutans*



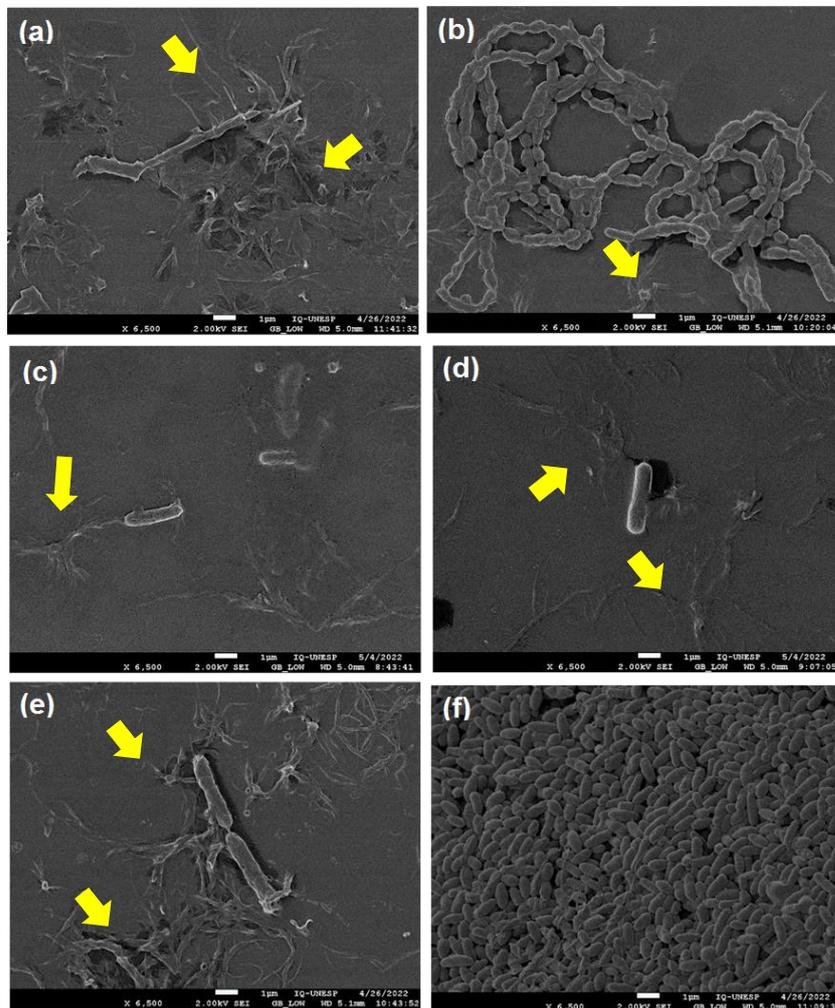
Os dados centrais para cada tempo, de cada tratamento avaliado, são as médias e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). A concentração do controle de veículo em cada poço foi 5,25% EtOH e 0,94% DMSO. Os experimentos foram realizados em duplicata em duas ocasiões distintas (n=2).

Fonte: Elaboração própria.

### 5.4.1 Estrutura tridimensional de culturas planctônicas via MEV

A análise MEV mostrou que tanto AcOEt quanto CsF promoveram de ruptura das células planctônicas de *S. mutans* (Figuras 21 A a 21 D). Nas imagens observa-se presença de material amorfo que é oriundo das células rompidas, sendo remanescentes da parede celular e conteúdo intracelular extravasado (setas). A topografia da superfície de culturas tratadas por controle veículo (Figura 21 F) mostra que este tratamento não tem efeito sobre a morfologia celular de *S. mutans*.

**Figura 21** - Imagens de MEV mostrando as células de *S. mutans* após tratamentos



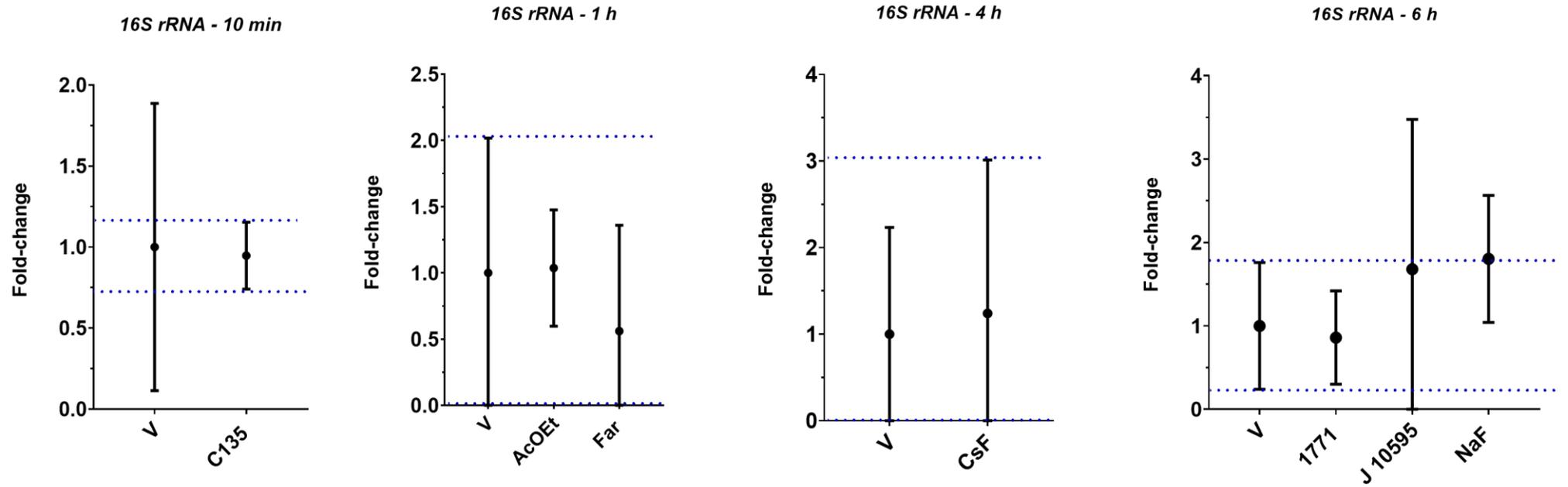
Imagens representativas de MEV de células planctônicas de *S. mutans* após em diferentes tempos de exposição aos tratamentos CsF e AcOEt. **(a)** CsF 125 µg/mL por 4h; **(b)** CsF 125 µg/mL por 24h; **(c)** AcOEt\_BRA/DF 250 µg/mL por 2 h; **(d)** AcOEt\_BRA/DF 250 µg/mL por 4h; **(e)** AcOEt\_BRA/DF 250 µg/mL por 24h; **(d)** Controle veículo (5,25% EtOH e 0,9375%) DMSO por 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata em duas ocasiões distintas (n=4). As barras de escala são de 1 µm.

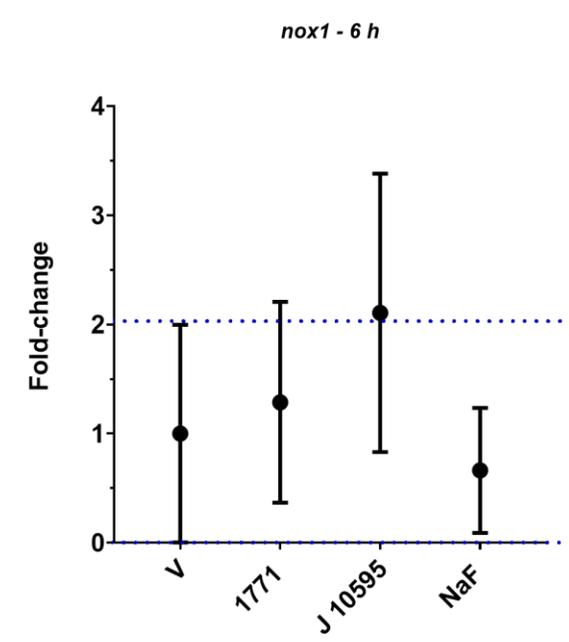
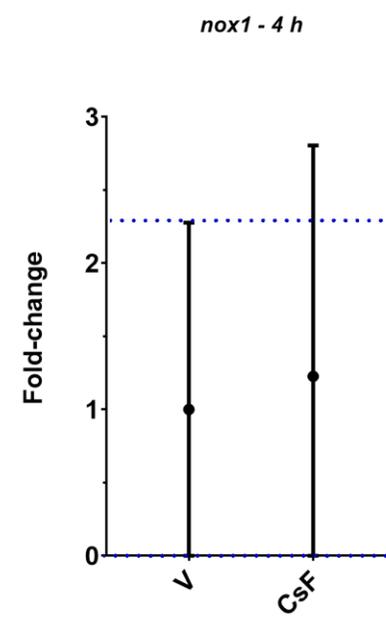
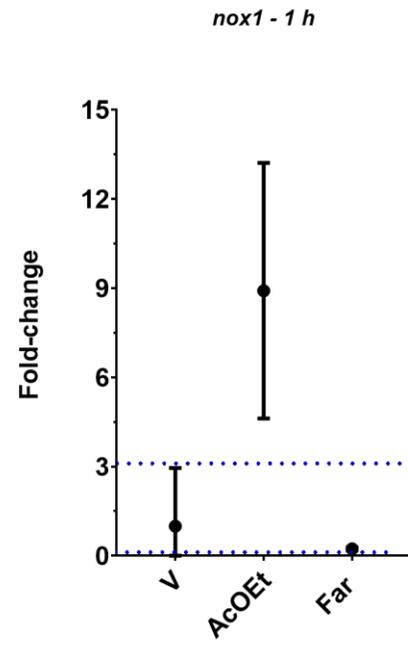
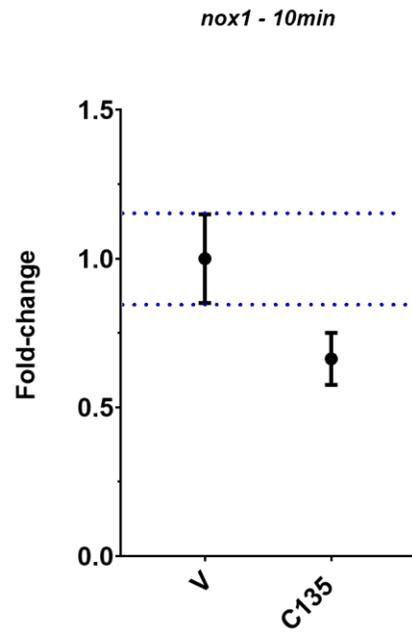
Fonte: Elaboração própria

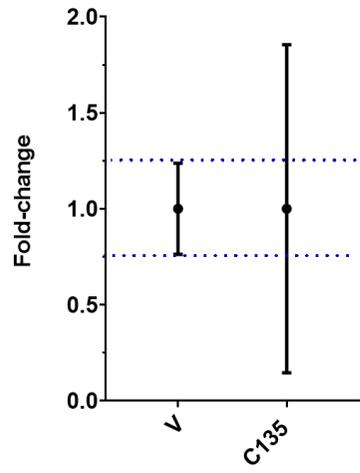
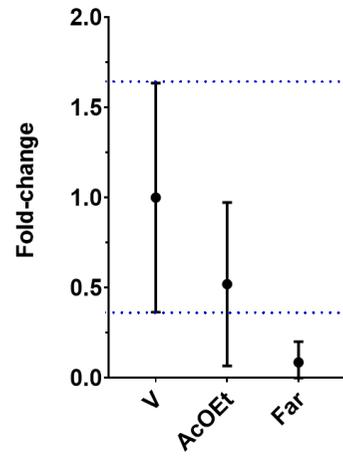
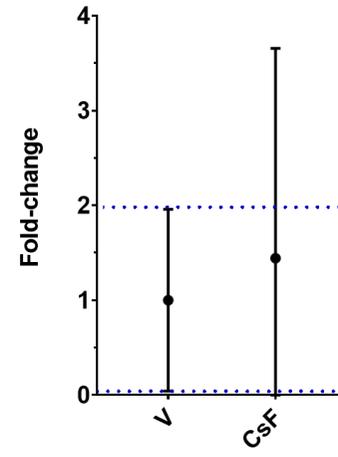
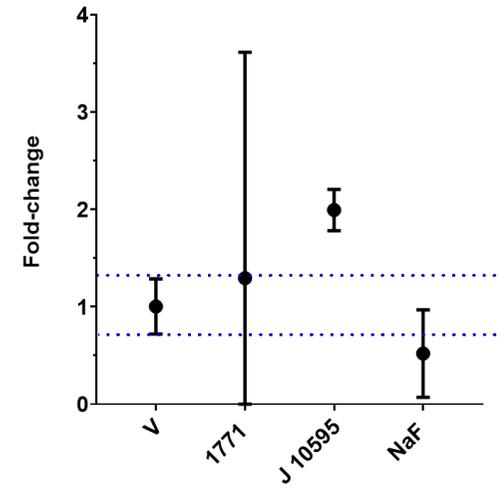
### 5.4.2 Expressão gênica

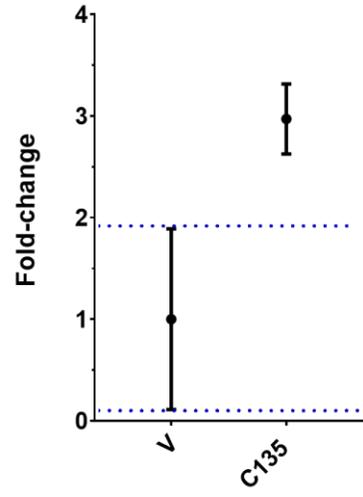
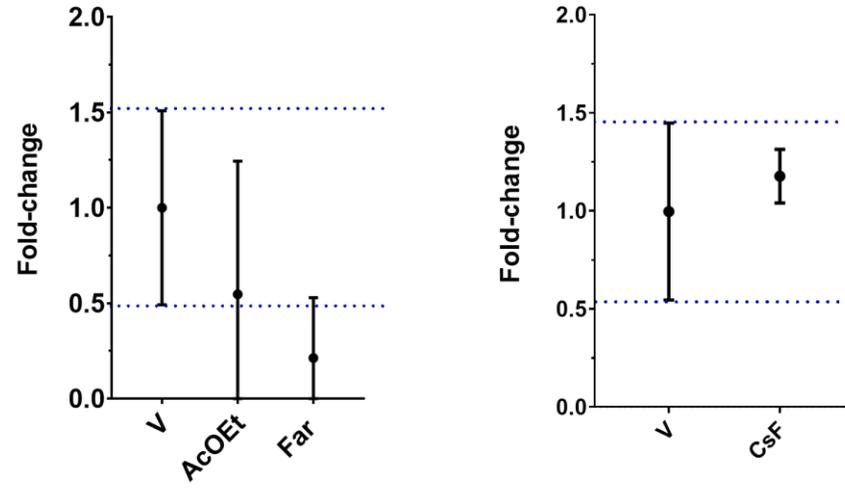
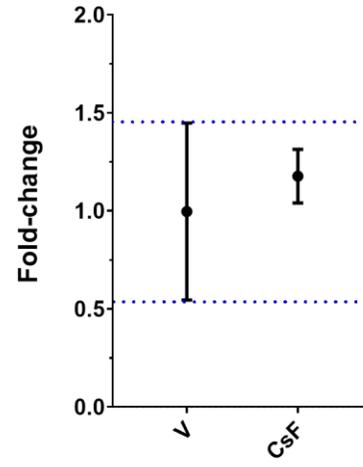
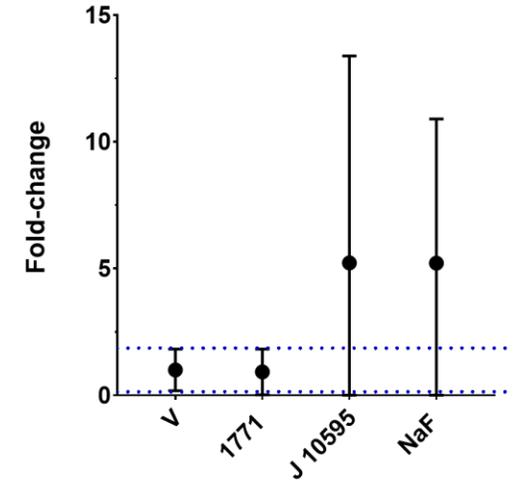
O efeito de sete tratamentos selecionados na expressão do gene de *S. mutans* está representado na Figura 22 (comparados com o controle veículo). Os dados foram obtidos em 1 ocasião experimental, e quantificação de expressão por qPCR em triplicata. Os genes não foram normalizados por *16S rRNA* porque houve uma diferença na expressão entre os tratamentos miricetina (J10595) e NaF vs. veículo. Observou-se que para o gene normalizador *16S rRNA*, houve uma maior expressão pós-tratamento com miricetina (J10595) e NaF. Para o gene *nox1*, a expressão gênica foi infraregulada por C135 e induzida por AcOEt e miricetina (J10595). Para *eno*, há significativa redução da expressão para AcOEt, *tt*-farnesol (Far) e NaF, em contraste com o observado para miricetina (J10595), que aumentou a expressão desse gene. A exposição aos tratamentos C135, miricetina (J10595) e NaF promoveu aumento da expressão gênica de *atpD*, enquanto a exposição ao *tt*-farnesol, infraregulou a expressão de *atpD*.

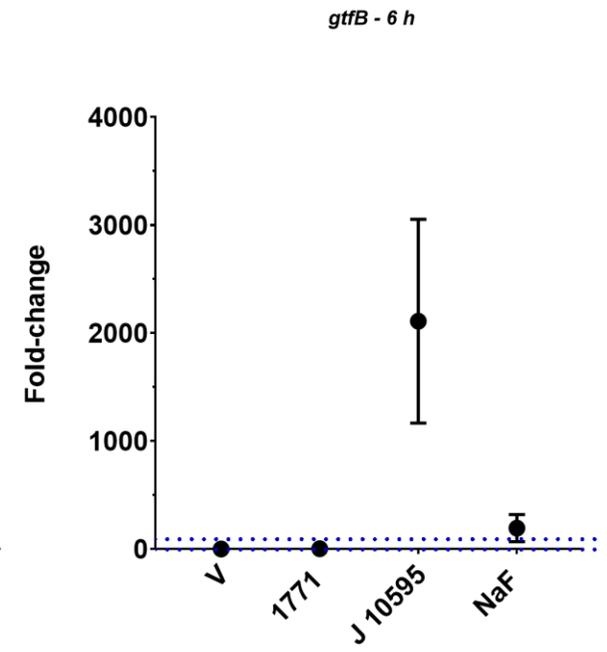
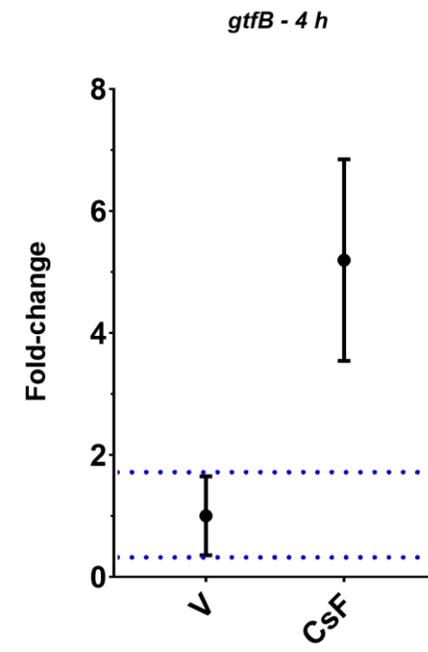
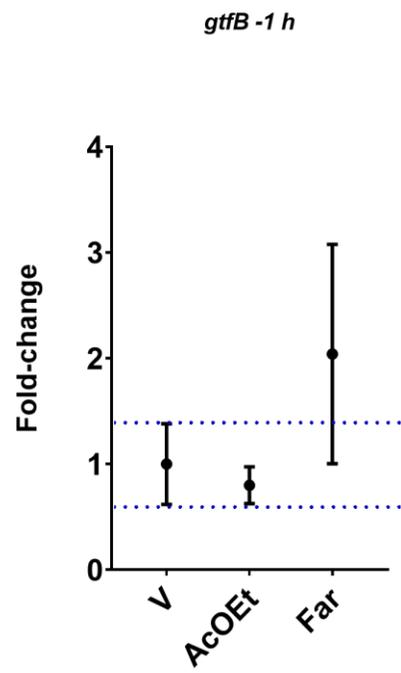
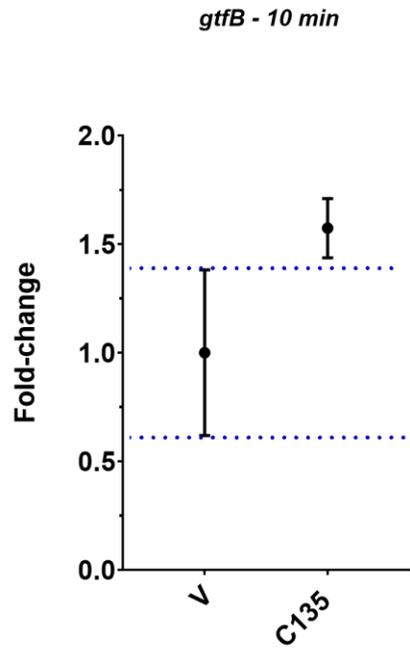
O gene *gtfB*, que codifica exoenzima que sintetiza exopolissacarídeos insolúveis, apresentou maior expressão em culturas tratadas por C135, *tt*-farnesol, CsF, miricetina (J10595) e NaF. Em contraste, parece que AcOEt reduz a expressão deste gene (a análise da composição química ajudará na explicação deste achado). Quanto ao *lrgA*, há maior expressão gênica pós-tratamento com C135, composto 1771 e miricetina (J10595). Isso demonstra que o produto deste gene, LrgA que é responsável por coordenar a remodelagem da membrana citoplasmática (processo que ligera eDNA) pode ser afetado diretamente ou indiretamente porque os agentes interferiram com a fluidez da membrana.

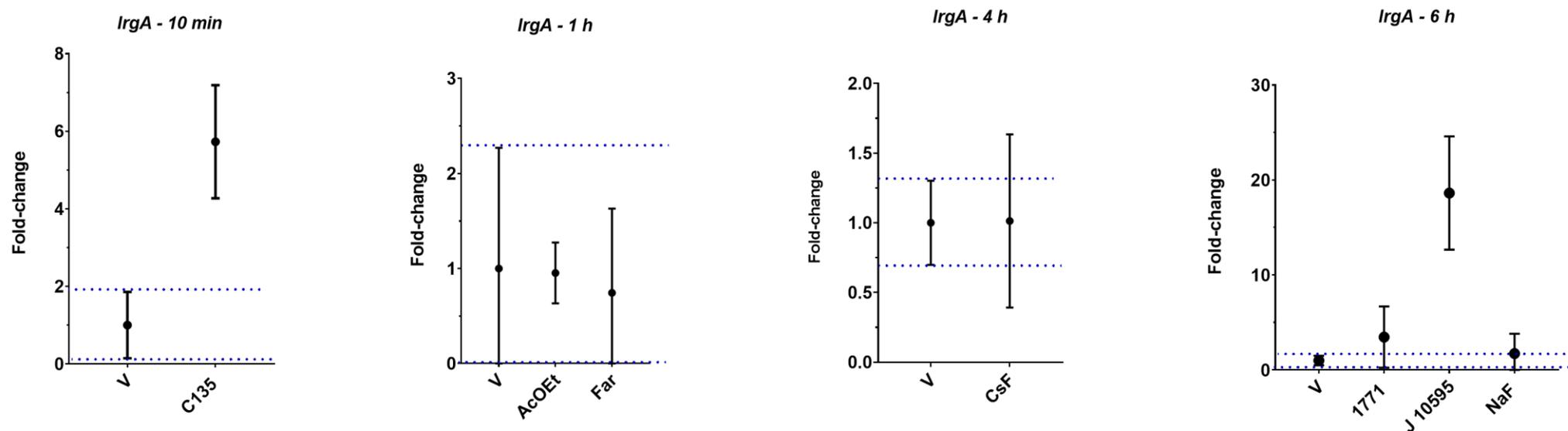
**Figura 22-** Expressão gênica da curva de inibição de crescimento



*eno - 10 min**eno - 1 h**eno - 4 h**eno - 6 h*

*atpD* - 10 min*atpD* - 1 h*atpD* - 4 h*atpD* - 6 h





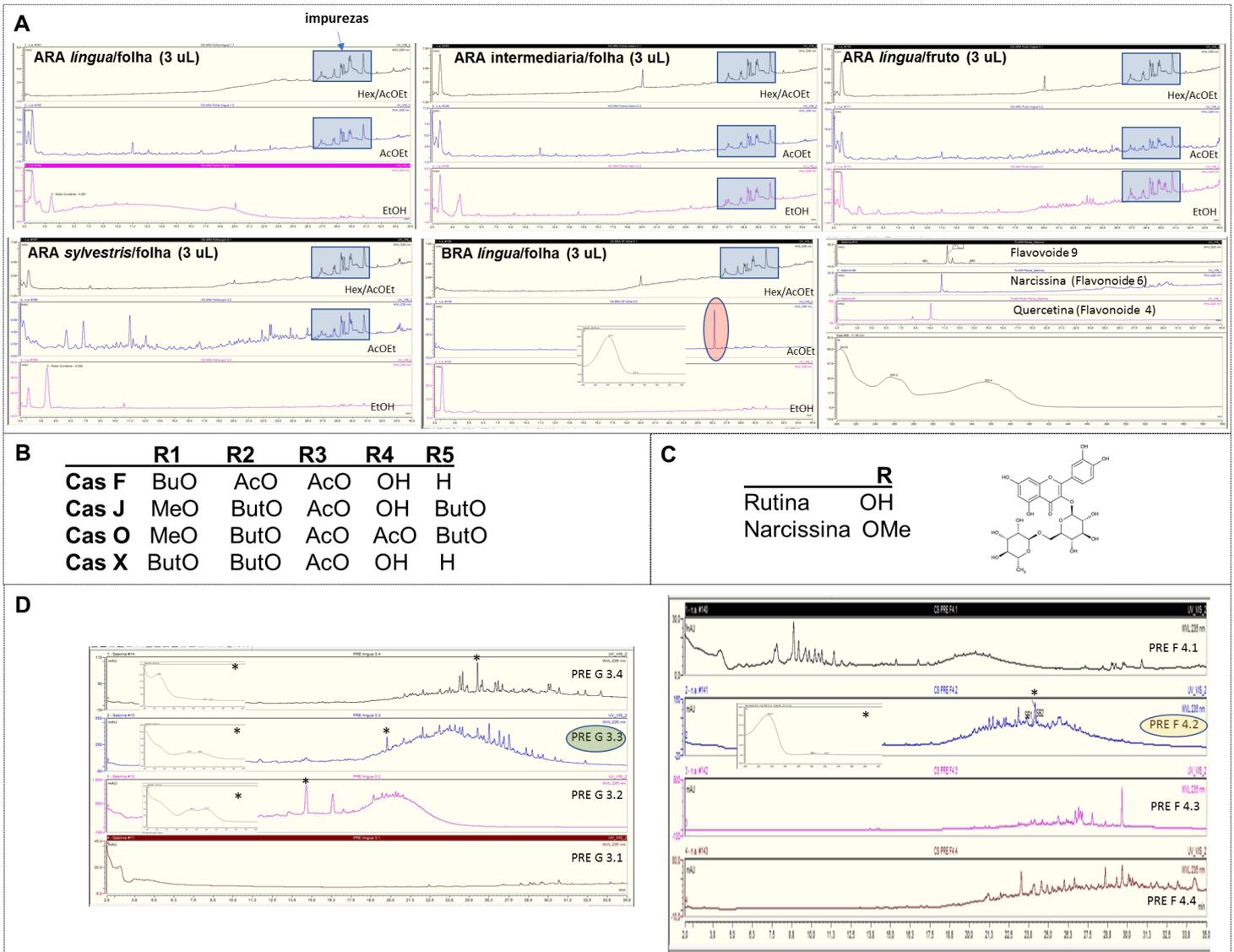
O dado central é a média e as barras de erro o intervalo de confiança (IC95%). O pontilhado em azul usa dos dados de veículo como referência para comparação da eficácia dos tratamentos testados. O controle Veículo está representado por V (concentração do 5,26% EtOH e 0,94% DMSO). Os experimentos realizados em 1 ocasião experimental e a quantificação de expressão por qPCR em triplicata. Veja o gráfico da expressão de *gtfB* - 6 h para 1771 vs. V na Figura 1 do Apêndice E.

Fonte: Elaboração própria.

### 5.5 Perfil Químico das Frações de *C. sylvestris*

Para as amostras de frações de *C. sylvestris* obtidas pelas metodologias 1 e 2, o perfil químico apresentou bandas que não puderam ser relacionadas aos principais metabólitos secundários já descritos para esta espécie, ou seja, flavonóides e diterpenos clerodânicos, com exceção de fração AcOEt obtida do extrato de folhas de *C. sylvestris* coletadas em Brasília-DF (BRA/DF). Esta fração é claramente enriquecida por um constituinte cujo espectro UV é característico das casearinas, com  $\lambda_{max}$  em 241 nm (Figura 23 A). A relação dos diterpenos clerodânicos com a atividade antibiofilme foi confirmada pelos dados apresentados na Figura 15 para CsF, onde são confrontadas as atividades da fração AcOEt\_BRA/DF e casearinas (X, F, J e O; Figura 23 B) e padrões de flavonoides glicosilados (narcissina, rutina e quercetina; Figura 23 C). Para a fração AcOEt\_BRA/DF, o pico principal foi identificado via cromatografia que indica uma casearina. No entanto, este pico difere neste momento dos picos das outras casearinas utilizadas neste estudo (F, X e J). Portanto, colocaríamos a hipótese de que em AcOEt\_BRA/DF haja a presença de uma casearina ainda não identificada. Assim, futuramente será realizado a identificação desta molécula. Para as frações EFS-C18 de Presidente Venceslau (PRE/SP), seus perfis cromatográficos indicam que são frações ricas em diterpenos clerodânicos e possivelmente taninos (Figura 23 D).

**Figura 23 - O perfil químico das frações de *C. sylvestris***



**A.** O perfil químico das frações AcOEt das amostras de *C. sylvestris*; **B.** Substituintes das casearinas, onde: BuO = grupo  $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{CO}_2$ ; MeO = grupo  $\text{OCH}_3$  (metoxila); grupo AcO =  $\text{CH}_3\text{CO}_2$  (acetato); OH = grupo O-H (hidroxila); H = hidrogênio; **C.** Estrutura dos flavonoides de *C. sylvestris* e seus substituintes; **D.** O perfil químico das frações EFS-C18 obtidas de Presidente Venceslau/SP.

Fonte: Elaboração própria.

## DISCUSSÃO

*C. sylvestris* possui composição fitoquímica marcada pela presença de diterpenos do tipo clerodano e flavonoides glicosilados. Estudos de prospecção desta planta mostraram atividade contra biofilmes cariogênicos. Portanto, é de interesse da comunidade que suas propriedades biológicas sejam exploradas<sup>22,23,220</sup>. Nossos resultados indicam que a fração AcOEt de BRA/DF (var. *lingua* e bioma Cerrado) e a molécula CsF de *C. sylvestris* são eficazes contra diferentes configurações de biofilme em fundo de placa (iniciais e pré-formados), no entanto, a aplicação tópica não exerce qualquer atividade sobre os componentes do biofilme de *S. mutans* formado sobre discos sHA (população viável, biomassa, componentes da matriz extracelular e organização estrutural). A inclusão dessas duas variáveis (bioma e variedade) é vital, pois influenciam na variabilidade da composição química dos metabólitos secundários e modula a resposta biológica<sup>22</sup>, como demonstrado aqui. Esses achados indicam que o efeito antibiofilme encontrado nos modelos de fundo de placa de poliestireno pode ter sido principalmente devido à exposição prolongada (24h) durante ou após a formação do biofilme. Além disso, a atividade desses tratamentos deveu-se principalmente à ação antibacteriana, verificada no ensaio de inibição do crescimento em cultura planctônica.

Através de um modelo de triagem rápida de compostos ativos de origem de plantas<sup>205</sup>, avaliamos a atividade antimicrobiana e antibiofilme (biofilmes iniciais e pré-formados) de extratos brutos, frações e moléculas isoladas de *C. sylvestris* após exposição longa de 24h aos tratamentos. Este modelo de triagem permite avaliar um maior número de amostras em um único experimento além de permitir a identificação de novos extratos/frações/moléculas com potenciais efeitos inibitórios, ainda, este método permite o controle das etapas de tratamento de forma consistente<sup>205</sup>. Em contraste com nosso estudo anterior, aqui nenhum extrato bruto de *C. sylvestris* apresentou atividade contra os modelos de exposição longa (24h), o que demonstra que a composição química de metabólitos secundários está intimamente relacionada à localização geográfica, efeitos sazonais e diversidade biológica e influencia drasticamente a atividade biológica das amostras<sup>23,139</sup>.

Neste modelo de exposição prolongada, as frações AcOEt\_BRA/DF e EFS-C18 de PRE/SP (Água/EtOH 60:40 - F4.2b e Água/EtOH 40:60 - G3.3a) reduziram a população dos biofilmes iniciais tratados. Ainda, entre as moléculas isoladas, apenas

CsF demonstrou atividade contra biofilmes pré-formados. CsF é um diterpeno clerodânico, de fórmula molecular  $C_{28}H_{40}O_8$ , que foi anteriormente isolado do extrato etanólico da folha de *C. sylvestris*<sup>22</sup>. A estrutura química de CsF parece ser relevante para sua atividade biológica contra *S. mutans*. A presença de OAc nos terminais R2 e R3 de CsF parece influenciar na sua atividade pois, a troca por OBu (Casearina X -  $C_{32}H_{46}O_9$ ) e OMe (Casearina J -  $C_{31}H_{44}O_9$ ) em R1 e por OBu em R2 (Casearinas X e J) parece inibir significativamente a atividade das casearinas. Em contrapartida, estes tratamentos ao serem testados quanto ao efeito tópico (exposição breve) em biofilmes de *S. mutans*, não produziram efeito nos componentes dos biofilmes. Desta forma, para que tais agentes exerçam seu efeito seria necessário preparar soluções capazes de reterem eles na cavidade oral pelo tempo necessário para sua atuação. Portanto, futuramente estes tratamentos podem ser utilizados para carreamento em sistemas de liberação de fármacos (adequados para a cavidade oral) para prolongar o tempo de exposição à uma concentração adequada<sup>201,204</sup>.

Além da necessidade de um prolongado tempo de exposição para potencial atividade, algumas substâncias/moléculas com atividade antimicrobiana podem não ser um agente antibiofilme, bem como embora algumas substâncias/moléculas com atividade antibiofilme pode não ser de fato um antimicrobiano per se<sup>226</sup>. Isto foi observado para AcOEt\_BRA/DF e CsF, pois embora a exposição breve a estes tratamentos não tenha atividade, quando avaliados através da curva de inibição do crescimento de *S. mutans*, CsF interferiu na viabilidade de *S. mutans* após 1h de contato e a recuperação média de células sobreviventes foi constante até as 24 horas de ensaio, o que demonstra efeito bacteriostático. Entretanto, o perfil de sobrevivência bacteriano obtido para AcOEt\_BRA/DF mostrou morte celular após 1h de exposição, com efeito bactericida. Seria esperado que a molécula isolada fosse mais eficaz em erradicar o microrganismo do que a fração. No entanto, moléculas isoladas frequentemente não são tão eficazes quanto as frações ativas porque a atividade biológica do produto natural inteiro é resultado da atividade de interações sinérgicas ou aditivas de diferentes compostos na mistura e não de uma única molécula ativa<sup>139</sup>. A análise de MEV demonstra que esses tratamentos causam ruptura das células planctônicas de *S. mutans* e isso nos conduziu a hipotetizar que o mecanismo antimicrobiano esteja relacionado principalmente ao dano irreversível da membrana citoplasmática microbiana.

Para compreender os possíveis mecanismos de ação relacionados com a atividade biológica de CsF e AcOEt\_BRA/DF, células planctônicas de *S. mutans* foram também tratadas com diferentes agentes com alvos reconhecidos (composto 1771, miricetina, *tt*-farnesol, C135 e NaF) e após, avaliados quanto a expressão de genes de virulência. A exposição à miricetina (J10595) induziu a expressão gênica de *eno* e *atpD*. Para suportar a acidificação do ambiente ácido que produz, *S. mutans* desenvolveu respostas adaptativas de tolerância ácida através da indução de múltiplas vias celulares<sup>82</sup>, sendo que uma das principais defesas contra desafios ambientais, como o choque ácido, é a própria membrana bacteriana<sup>83</sup>. O gene *atpD* codifica uma subunidade funcional do sistema F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase que é ligado à membrana e importante para a sobrevivência de *S. mutans* mediante ao estresse. Portanto, a indução da expressão de *atpD* demonstra que as células reagiram a acidificação intracelular (citoplasmática) ocasionada pela maior atividade glicolítica (representada pela maior expressão de *eno*), e isso induziu a expressão de *atpD*<sup>73,85,86</sup>.

O gene *gtfB* codifica enzimas GtfB metaboliza a sacarose em glucanos insolúveis em água<sup>70</sup>, e aqui, observamos que CsF, *tt*-farnesol e miricetina (J10595) induziram a expressão desse gene. Este resultado foi inesperado porque o meio continha glicose e o substrato da enzima GtfB é sacarose, o que demonstra que o microrganismo estava expressando um gene crucial para sua sobrevivência em biofilme cariogênico. Pode ser que os agentes promovam estresse às células bacterianas em sua forma livre (planctônica) e como resposta a esta condição, o microrganismo responde com aumento da expressão gênica de *gtfB*. Para que isso ocorra, é comum um aumento concomitante da expressão de *atpD*, como observado para miricetina<sup>179,180</sup>. No entanto, miricetina (J10595) é um inibidor eficaz da expressão de *gtfB* em solução, enquanto o *tt*-farnesol tem como alvo a membrana citoplasmática, diminuindo a tolerância ácida de *S. mutans* e interferindo com a atividade da enzima GtfB<sup>183,197</sup>. Assim, parece que as células em biofilme e as células em sua forma livre respondem de forma diferente pelos agentes e por isso, o perfil de expressão de *gtfB* do nosso estudo difere dos anteriores, em que os agentes foram testados em biofilmes através de breve exposição<sup>179,180,183,197,198</sup>. Outra possibilidade é que a indução da expressão gênica pelos agentes seja resultado da perturbação da atividade de genes reguladores de componentes de *quorum sensing*<sup>179,180</sup>.

Para *IrgA*, houve aumento da expressão gênica pós-tratamento com C135, composto 1771 e miricetina (J10595). Este gene é programado para se ativar

brevemente no final do crescimento exponencial (fase *mid-log*) de *S. mutans*, a medida que ocorre esgotamento de glicose e de oxigênio e que há disponibilidade de piruvato extracelular<sup>103</sup>. A indução da expressão de *lrgA* e alterações na expressão de genes ligados à alterações na membrana (por exemplo, indução da expressão de *atpD* para C135) demonstra que esses agentes comprometem a aptidão de *S. mutans*, pois, LrgA (produto de *lrgA*) é uma proteína associada à membrana e controla a autólise e a morte celular, modulando a permeabilidade da parede celular bacteriana<sup>98,99</sup>. As alterações nos perfis de ácidos graxos afetam a função da F-ATPase e a permeabilidade geral da membrana, alterando a capacidade de *S. mutans* de manter o  $\Delta$ pH intracelular, prejudicando muito a tolerância ao ácido, isto induz a expressão de *atpD*, como observado para C135 e miricetina (J10595).

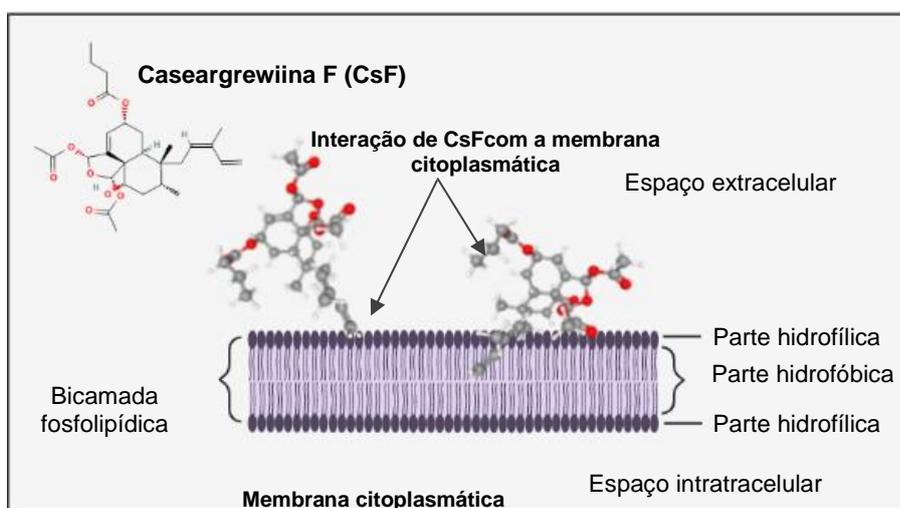
Alterações da expressão gênica de *nox1* altera a composição de ácidos graxos da membrana microbiana e interfere na atividade do seu produto (Nox)<sup>90,93,94</sup>. Essa enzima metaboliza o oxigênio utilizado por *S. mutans* e eleva sua atividade quando as células são expostas a condições de estresse oxidativo e baixo pH<sup>90,92</sup>. Isso demonstra que o produto Nox pode ser afetado direta ou indiretamente por C135, AcOEt\_BRA/DF e miricetina (J10595) através de alterações da fisiologia da membrana. Além disso, AcOEt\_BRA/DF, *tt*-farnesol e NaF parecem influenciar a acidez citoplasmática e prejudicar a função normal das enzimas envolvidas na glicólise (enolase) e produção de EPS (GtfB), porque estes agentes infraregularam a expressão de *eno*. Alterações na expressão desse gene promove um potencial efeito letal sobre *S. mutans*<sup>135</sup>, como observado pelos danos estruturais causados por AcOEt\_BRA/DF (dados observados via MEV). A infraregulação de *eno* para *tt*-farnesol e NaF já era esperado, uma vez que *tt*-farnesol reduz a atividade glicolítica de *S. mutans*<sup>183,184</sup> e é bem estabelecido que *eno* é alvo de fluoreto<sup>78</sup>.

O gene *atpD* foi infraregulado pós-tratamento com *tt*-farnesol e parece ocorrer redução para AcOEt, embora a magnitude não seja relevante neste tempo de exposição. Isto reforça que os tratamentos acidificam a citoplasmática, que por sua vez, prejudica a função normal das enzimas envolvidas na glicólise (enolase), como já demonstrado para *tt*-farnesol<sup>183,184</sup>. Isto explicaria o efeito bactericida de AcOEt e também os danos estruturais, principalmente na parede celular de *S. mutans*, observados através das imagens de MEV. A análise da composição química do AcOEt\_BRA/DF (em andamento) ajudará a identificar qual casearina está envolvida na atividade biológica desta fração.

CsF é um diterpeno clerodânico e as frações AcOEt são ricas fontes deste metabólito secundário (especificamente casearinas)<sup>23</sup>. Portanto, propomos que os resultados biológicos deste estudo estejam intimamente relacionados com esta classe de metabólitos secundários. A análise da estrutura química de diferentes diterpenos e a correlação entre suas estruturas e sua capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans*, demonstra que algumas características estruturais são essenciais para a atividade antimicrobiana dos diterpenos<sup>247</sup>.

A atividade antimicrobiana dos diterpenos ocorre pela sua capacidade de promover lise bacteriana e ruptura da membrana citoplasmática. Esta atividade ocorre por meio das características estruturais dos diterpenos; estes compostos possuem uma estrutura lipofílica, capaz de inserção na membrana celular e um fragmento hidrofílico com um grupo doador de ligação de hidrogênio, que interage com grupos fosforilados da membrana<sup>30</sup>. Nossa hipótese é que o efeito biológico obtido para CsF e AcOEt\_BRA/DF está associado à capacidade bacteriostática e/ou bactericida devido as alterações na membrana de *S. mutans*. Além disso, as interações agente-membrana possivelmente ocorrem durante a divisão celular ou remodelação da parede celular, pois estes eventos facilitam a entrada e/ou interação do composto com a membrana citoplasmática (Figura 24). O motivo da AcOEt\_BRA/DF ser um agente bactericida, ao contrário da CsF, que possui atividade bacteriostática, parece estar relacionado à presença de uma nova casearina ainda não identificada na literatura. Portanto, estamos trabalhando em análises adicionais para identificar esse metabólito.

**Figura 24** - Modelo proposto do efeito de CsF com a membrana citoplasmática de *S. mutans*



Fonte: Elaboração própria com a estrutura química bidimensional de CsF obtida do PubChem<sup>248</sup>.

A capacidade de interromper efetivamente as vias específicas e essenciais para o estilo de vida do biofilme de patógenos bacterianos, tudo sem afetar a viabilidade da flora normal, é uma abordagem atraente para a prevenção e/ou redução de doenças relacionadas ao biofilme, especialmente aquelas que ocorrem em ambientes complexos microambientais, como a boca humana<sup>139</sup>. Considerando os achados deste estudo, CsF e AcOEt\_BRA/DF trazem novas e significativas perspectivas para o desenvolvimento de agentes seletivos antibiofilme/antimicrobiano para aplicações na prevenção de cárie dentária. Embora os detalhes de citotoxicidade destes agentes não tenham sido investigados aqui, nosso estudo anterior demonstrou toxicidade baixa/moderada para concentrações maiores de extratos brutos de *C. sylvestris* em modelos de exposição prolongada. Futuramente, esses tratamentos serão avaliados quanto sua atividade citotóxica através de modelos de cultura tridimensionais. Além disso, é necessário verificar a seletividade de atividade antimicrobiana contra microrganismos comensais e constituintes de biofilmes associados com a saúde.

A compreensão de resultados *in vitro* requer ponderação para não superestimar dados biológicos. Para selecionar agentes com potencial atividade antimicrobiana e/ou antibiofilme, empregamos o modelo de triagem rápida utilizando placas de poliestireno. No entanto, ressalta-se que não refletem o complexo microbiano, ecológico e nem as influências ambientais encontradas na cavidade oral<sup>23,139</sup>. Assim, para validar as propriedades encontradas em nossas condições de estudo, futuramente serão realizados ensaios *in vitro* para carreamento em sistemas de liberação de fármacos para prolongar o tempo de exposição à uma concentração adequada. Ainda, assumindo uma capacidade comum de interagir com a membrana celular de *S. mutans*, propomos como futuras investigações a simulação da inserção destes agentes em um modelo de membrana fosfolipídica, na tentativa de validar nossas conclusões sobre as relações estrutura-atividade dessa classe de compostos<sup>30</sup>. Portanto, dentro das limitações deste estudo *in vitro*:

a) Extratos brutos das folhas de *C. sylvestris* (populações ARA/SP, BRA/DF e PRE/SP) não apresentaram atividade antimicrobiana e contra a formação inicial de biofilme (24h) de *S. mutans*. As frações AcOEt\_BRA/DF reduziram a população dos biofilmes tratados independente da metodologia usada para sua obtenção, além disso, não houve variabilidade dos dados para as duas diferentes formas de obtenção desta fração. No entanto, a mesma não apresentou atividade contra

biofilme pré-formado de *S. mutans*. As frações PRE/SP\_EFS-C18 (F4.2b e G3.3a) interferiram na formação inicial de biofilme (24h) de *S. mutans* e Caseargrewiina F apresentou atividade contra biofilme pré-formado de *S. mutans*;

- b) As soluções propostas com estes agentes não demonstraram qualquer efeito quando aplicadas topicamente sobre discos de hidroxiapatita revestidos com película salivar independente da concentração e tempo de exposição (1,5 ou 10 min). Hipotetizamos que o efeito antibiofilme encontrado no modelo em fundo de placa pode ter sido principalmente pela exposição prolongada (24 horas de exposição durante a formação inicial do biofilme ou após a formação inicial) sendo a atividade majoritariamente devido à ação antibacteriana, ou seja, morte celular);
- c) Para testar nossa hipótese, as frações BRA/DF\_AcOEt e CsF foram avaliadas em cultura planctônica para determinar o período mínimo necessário para matar as células. CsF interferiu na viabilidade de *S. mutans* especialmente após 1h e apresenta efeito bacteriostático. Enquanto BRA/DF\_AcOEt resultou em morte celular após 1h de exposição, demonstrando característica atividade bactericida. O perfil de expressão gênica de CsF e BRA/DF\_AcOEt demonstram similaridade ao de agentes com alvos previamente reconhecidos. Além disso, os dados de expressão gênica sugerem que atividade CsF e BRA/DF\_AcOEt esteja relacionado à danos estruturais na membrana de *S. mutans*, ainda, as análises de MEV mostrou mais o efeito na parede celular. A razão pela qual a fração AcOEt\_BRA/DF é um agente bactericida parece estar relacionado à presença de uma nova casearina ainda não identificada na literatura.

## 7 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a Caseargrewiina F (um diterpeno clerodânico isolado das folhas de *C. sylvestris*) e uma fração acetato de etila (extraídas de folhas da população Brasília/DF; bioma Cerrado, var. *lingua*) são eficazes na inibição de *S. mutans* através de danos irreversíveis em sua estrutura e alterações na expressão de genes de virulência específicos.

## REFERÊNCIAS\*

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T 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. *J Dent Res*. 2017; 96(4): 380-87.
2. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018; 26(3): 229-42.
3. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020; 54(1): 7-14.
4. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(7): 471-80.
5. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011; 45(1): 69-86.
6. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. *J Dent Res*. 2006; 85(10): 878-87.
7. Vacca-Smith A, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol*. 1998; 43(2): 103-10.
8. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(18): 6357-67.
9. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog*. 2012; 8(4): e1002623.
10. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013; 92(12): 1065-73.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33
12. Klein MI, Hwang G, Santos PH, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans* derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5(10): 1-10.
13. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR, Klein MI. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2017; 33(9): 722-40.
14. Cury JA, de Oliveira BH, dos Santos AP, Tenuta LM. Are dental fluoride releasing materials clinically effective on caries control? *Dent Mater.* 2016; 32(3): 323-33.
15. Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons learned from clinical studies: roles of *mutans streptococci* in the pathogenesis of dental caries. *Curr Oral Health Rep.* 2014; 1(1): 70-8.
16. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(2): 156-67.
17. Tribble GD, Angelov N, Weltman R, Wang BY, Eswaran SV, Gay IC et al. Frequency of tongue cleaning impacts the human tongue microbiome composition and enterosalivary circulation of nitrate. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 39.
18. Freires IA, Rosalen PL. How natural product research has contributed to oral care product development? a critical view. *Pharm Res.* 2016; 33(6): 1311-7.
19. Ferreira PMP Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Barros FW, Martins AM, Cavalheiro AJ et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais Acad Bras Cienc.* 2011; 83(4): 1373-84.
20. Xia L, Guo Q, Tu, Chai X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev.* 2015; 14: 99-135.
21. Claudino JC, Sacramento LV, Koch I, Santos HA, Cavalheiro AJ, Tininis AG et al. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. *Anais Acad Bras Cienc.* 2013; 85(4): 1253-65.
22. Bueno PCP, Pereira FMV, Torres RB, Cavalheiro AJ. Development of a comprehensive method for analysing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra-high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. *J Sep Sci.* 2015; 38: 1649-56.
23. Ribeiro SM, Fratucelli ÉDO, Bueno PCP, de Castro MKV, Francisco AA, Cavalheiro AJ et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 12: 19(1): 308.

24. Spósito L, Oda FB, Vieira JH, Carvalho FA, Dos Santos Ramos MA, de Castro RC et al. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives. J Ethnopharmacol. 2019; 233: 1-12;
25. Bueno PCP, Abarca LFS, Anhesine NB, Giffoni MS, Pereira FMV, Torres RB et al. Intraspecific chemical variability and biological activity of *casearia sylvestris* from different brazilian biomes. Planta Med. 2021; 87(1-02): 148-59.
26. Dos Santos AL, Amaral M, Hasegawa FR, Lago JHG, Tempone AG, Sartorelli P. (-)-T-Cadinol-a Sesquiterpene isolated from *Casearia sylvestris* (salicaceae)-displayed *in vitro* activity and causes hyperpolarization of the membrane potential of *tTrypanosoma cruzi*. Front Pharmacol. 2021; 12: 734127.
27. Ferreira PMP, Bezerra DP, Silva JDN, da Costa MP, Ferreira JRO, Alencar NMN et al. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. J Ethnopharmacol. 2016; 186: 270-9.
28. Chen H, Tan RX, Liu ZL, Zhao CY, Sun J. A clerodane diterpene with antibacterial activity from *Ajuga lupulina*. Acta Crystallogr C. 1997; 53(Pt 6): 814-6.
29. Silva SL, Chaar JDS, Damico DCS, Figueiredo PMS, Yano T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. Pharm Biol. 2008; 46: 347-51.
30. Urzúa A, Rezende MC, Mascayano C, Vásquez L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. Molecules. 2008; 13(4): 882-91.
31. Tavares WLF, Apolônio ACM, Gomes RT, Teixeira KIR, Brandão MGL, Santos VR. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2008; 29(3): 257-60.
32. Cavalheiro AH, Godo AP, Carvalho TC, Catirse AB, Furtado NAJC. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. Rev Odontol UNESP. 2016; 45(4): 214-8.
33. WHO – World Health Organization [homepage na Internet]. 15 de Março de 2022. [acesso em 2022 abr 25]. Disponível em URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>.
34. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. Lancet. 2007; 369 (9555): 51-9.
35. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. Int J Dent. 2011; 2011: 953412.
36. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Arch Oral Biol. 1960; 1: 304-20.
37. Newbrun E. Cariology. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1983.

38. Costa SM, Adelário AK, Vasconcelos M, Abreu MHNG. Modelos explicativos da cárie dentária: do organicista ao ecossistêmico. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2012; 12(2): 285-91.
39. Slayton RL, Slavkin HC. Scientific investments continue to fuel improvements in oral health (May 2000-Present). *Academic Pediatrics.* 2009; 383-5.
40. Watt R G, Daly B, Allison P et al. Ending the neglect of global oral health: time for radical action. *Lancet* 2019; 394: 261-72.
41. Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res.* 2015; 94(10): 1355-61.
42. Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A disease which needs attention. *Indian J Pediatr.* 2018; 85(3): 202-6
43. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais/Ministério da Saúde [suporte em meio eletrônico]. Brasil: Ministério da Saúde; 2012 [acesso 2021 out 26]. Disponível em [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa\\_nacional\\_saude\\_bucal.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf).
44. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 80-7.
45. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog.* 2010; 6(1): e1000713.
46. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1): 137-43.
47. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbionaev.* 2002; 15(2): 167-93.
48. Karnoutsos K, Papastergiou P, Stefanidis S, Vakaloudi A. Periodontitis as a risk factor for cardiovascular disease: the role of anti-phosphorylcholine and anti-cardiolipin antibodies. *Hippokratia.* 2008; 12(3): 144-9
49. Rickard H Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Hannaey PS. Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 11(2): 94-100.
50. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res.* 2007; 6(6): 2152-60.
51. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73(3): 407-50.
52. Palmer CA, Kent R Jr, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood carie. *J Dent Res.* 2010; 89(11): 1224-9

53. Florez Salamanca EJ, Klein MI. Extracellular matrix influence in *Streptococcus mutans* gene expression in a cariogenic biofilm. *Mol Oral Microbiol.* 2018; 33(2): 181-93.
54. Castillo Pedraza MC, Rosalen PL, de Castilho ARF, Freires IA, de Sales Leite L, Faustoferri RC et al. Inactivation of *Streptococcus mutans* genes *lytST* and *dltAD* impairs its pathogenicity in vivo. *J Oral Microbiol.* 2019;11(1): 1607505.
55. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005;13: 20-6.
56. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1992; 60(1): 284-95.
57. Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn SJ 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. *J Bacteriol.* 2014; 196 (13): 2355-66.
58. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(10): 3405-08.
59. Neuhaus FC, Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(4): 686-723.
60. Rölla G, Oppermann R, Bowen WH, Ciardi JE, Knox KW. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque in vivo. *Caries Res.* 1980; 14(4): 235-8.
61. Klein MI, DeBaz L, Agidi S et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13478.
62. Melsen B, Kaae O, Rölla G, Fejerskov O, Karring T. Penetration of ions in human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1979; 24(1): 75-81.
63. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294-303.
64. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4):1407-17.
65. Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestål C, Strömberg N. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res.* 2001; 80(11): 2005-10.

66. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC et al. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Mol Microbiol.* 2010; 77(2): 276-86.
67. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017; 32(1): 2434.
68. Venkitaraman AR, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Bowen WH. Characterization of GlucosyltransferaseB, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74(10): 1695-70.
69. Bowen WH, Schilling K, Giertsen E, Pearson S, Lee SF, Bleiweis A et al. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. *Infect Immun.* 1991; 59(12): 4606-9.
70. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Schilling KM, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Res.* 1996; 30: 354-60.
71. Hamada S, Tai S, Slade HD. Binding of glucosyltransferase and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* and other bacteria. *Infect Immun.* 1978; 21(1): 213-20.
72. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, De Sales Leite L, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *J Oral Microbiol.* 2019; 11(1): 1581520.
73. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005; 7(1): 95-107.
74. Yang Y, Park BI, Hwang EH, You YO. Composition analysis and inhibitory effect of *Sterculia lychnophora* against biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016: 8163150.
75. Ajdić D, Pham VTT. Global transcriptional analysis of *Streptococcus mutans* sugar transporters using microarrays. *J Bacteriol.* 2007; 189(14): 5049-59.
76. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* 1993; 57(3): 543-94.
77. Colby SM, Russell RR. Sugar metabolism by mutans streptococci. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1997; 26: 80S-88S.
78. Guha-Chowdhury N, Clark AG, Sissons CH. Inhibition of purified enolases from oral bacteria by fluoride. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12(2): 91-7.
79. Ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res.* 2012; 91(9): 813-5.
80. Bunick FJ, Kashket S. Enolases from fluoride-sensitive and fluoride-resistant streptococci. *Infect Immun.* 1981; 34(3): 856-63.

81. Liao Y, Yang J, Brandt BW, Li J, Crielaard W, van Loveren C et al. Genetic loci associated with fluoride resistance in *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol.* 2018; 9: 3093.
82. Cotter PD, Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(3): 429-53
83. Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol.* 2000; 42: 239-74.
84. Fozo EM, Quivey RG Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(2): 929-36.
85. Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun.* 1986; 53(2): 331-8.
86. Kuhnert WL, Zheng G, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH. *J Bacteriol.* 2004; 186(24): 8524-8.
87. Tong H, Chen W, Merritt J, Qi F, Shi W, Dong X. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Mol Microbiol.* 2007; 63(3): 872-80.
88. Liu L, Tong H, Dong X. Function of the pyruvate oxidase-lactate oxidase cascade in interspecies competition between *Streptococcus oligofermentans* and *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(7): 2120-7.
89. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(22): 14434-9.
90. Derr AM, Faustoferri RC, Betzenhauser MJ, Gonzalez K, Marquis RE, Quivey RG Jr. Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(4): 1215-27.
91. Baker JL, Derr AM, Karuppaiah K, MacGilvray ME, Kajfasz JK, Faustoferri RC et al. *Streptococcus mutans* NADH oxidase lies at the intersection of overlapping regulons controlled by oxygen and NAD<sup>+</sup> levels. *J Bacteriol.* 2014; 196(12): 2166-77.
92. Higuchi M, Yamamoto Y, Kamio Y. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *J Biosci Bioeng.* 2000; 90(5): 484-93.
93. Yamamoto Y, Pargade V, Lamberet G, Gaudu P, Thomas F, Texereau J et al. The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol Microbiol.* 2006; 62(3): 772-85.

94. Pesakhov S, Benisty R, Sikron N, Cohen Z, Gomelsky P, Khozin-Goldberg I et al. Effect of hydrogen peroxide production and the Fenton reaction on membrane composition of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768(3): 590-7.
95. Smith EG, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res*. 2012; 91(2): 133-41.
96. Ahn SJ, Rice KC. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg system through CidB function. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82(20): 6189-203.
97. Charbonnier T, Le Coq D, McGovern S, Calabre M, Delumeau O, Aymerich S et al. Molecular and physiological logics of the pyruvate-induced response of a novel transporter in *Bacillus subtilis*. *mBio*. 2017; 8(5): e00976-17.
98. van den Esker MH, Kovács ÁT, Kuipers OP. From cell death to metabolism: holin-antiholin homologues with new functions. *mBio*. 2017; 8(6): e01963-17.
99. Ahn SJ, Rice KC, Oleas J, Bayles KW, Burne RA. The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156(Pt 10): 3136-3147.
100. Ahn SJ, Qu MD, Roberts E, Burne RA, Rice KC. Identification of the *Streptococcus mutans* LytST two-component regulon reveals its contribution to oxidative stress tolerance. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 187.
101. Ahn SJ, Gu T, Koh J, Rice KC. Remodeling of the *Streptococcus mutans* proteome in response to LrgAB and external stresses. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 14063.
102. Rice KC, Turner ME, Carney OV, Gu T, Ahn SJ. Modification of the *Streptococcus mutans* transcriptome by LrgAB and environmental stressors. *Microb Genom*. 2017; 3(2): e000104.
103. Ishkov IP, Ahn SJ, Rice KC, Hagen SJ. Environmental Triggers of *IrgA* Expression in *Streptococcus mutans*. *Front Microbiol*. 2020; 11: 18.
104. Worthington HV, MacDonald L, Poklepovic Pericic T, Sambunjak D, Johnson TM, Imai P et al. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dentin caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019; 4(4): CD012018.
105. van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(6): 214-28.
106. Sanz M, Serrano J, Iniesta M, Santa Cruz I, Herrera D. Antiplaque and antigingivitis toothpastes. *Monogr Oral Sci*. 2013; 23: 27-44.
107. Schuz B, Wiedemann AU, Mallach N, Scholz U. Effects of a short behavioural intervention for dental flossing: randomized-controlled trial on planning when, where and how. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(6): 498-505.

108. Ng E, Lim LP. An Overview of Different Interdental Cleaning Aids and Their Effectiveness. *Dent J (Basel)*. 2019; 7(2): 56.
109. Hardwick K, Barmes D, Richardson LM. International collaborative research on fluoride. *J Dent Res*. 2000; 79(4): 893-904.
110. Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad*. 2013; 42(2): 179-88.
111. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999; 27(1): 31-40.
112. Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control? *Dent Clin North Am*. 2015; 59(4): 799-829.
113. Jackson Rj. Metal salts, essential oils and phenols? old or new? *Periodontol* 2000. 1997; 15(1), 63-73.
114. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent*. 2020; 103: 103497.
115. Thangavelu A, Kaspar SS, Kathirvelu RP, SrinivasanaB, Srinivasan S, Sundram R. Chlorhexidine: an elixir for periodontics. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020; 12(1): S57-S59.
116. Ribeiro LG, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. *J Dent*. 2007; 35(5): 359-70.
117. Löe H, von der Fehr FR, Schiött CR. Inhibition of experimental caries by plaque prevention. The effect of chlorhexidine mouthrinses. *Scand J Dent Res*. 1972; 80(1): 1-9
118. Walsh T, Oliveira-Neto JM, Moore D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; (4): CD008457.
119. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitanaty and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(5): 1461-8.
120. Krishna MT, York M, Chin T, Gnanakumaran G, Heslegrave J, Derbridge C et al. Multi-centre retrospective analysis of anaphylaxis during general anaesthesia in the United Kingdom: aetiology and diagnostic performance of acute serum tryptase. *Clin Exp Immunol*. 2014; 178(2): 399-404.
121. Moka E, Siafaka I, Vadalouca A and Argyra E. Chlorhexidine: Hypersensitivity and anaphylactic reactions in the perioperative setting. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2015; 31(2): 145.

122. Ribeiro DA, Bazo AP, Da Silva Franchi CA, Marques ME, Salvadori DM. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *J Periodontal Res.* 2004; 39(5): 358-61.
123. Cabral C T, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig.* 2007; 11(2): 155-64.
124. Chi DL, Scott JM. Added Sugar and Dental Caries in Children: A scientific update and future steps. *Dent Clin North Am.* 2019; 63(1): 17-33.
125. Tinanoff N, Palmer CA. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. *J Public Health Dent.* 2000 Summer; 60(3): 197-206; discussion 207-9.
126. Mobley CC. Nutrition and dental caries. *Dent Clin North Am.* 2003; 47(2):319-36.
127. Hayes C. The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *J Dent Educ* 2001; 65(10): 1106-9.
128. Machiulskiene V, Nyvad B, Baelum V. Caries preventive effect of sugar-substituted chewing gum. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2001; 29(4): 278-88.
129. Mira A. Oral microbiome studies: potential diagnostic and therapeutic Implications. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 71-7.
130. Zaura E, Twetman S. Critical appraisal of oral pre- and probiotics for caries prevention and care. *Caries Res.* 2019; 53(5): 514-26.
131. Bijle MN, Neelakantan P, Ekambaram M, Lo ECM, Yiu CKY. Effect of a novel synbiotic on *Streptococcus mutans*. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 7951.
132. Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y et al. Combinatorial effects of arginine and fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.* 2015; 94(2): 344-53.
133. Twetman S, Keller MK. Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res.* 2012; 24(2): 98-102.
134. Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017; 22(3): e282-8.
135. Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.* 1990; 69: 660-7.
136. Keller MK, Kressirer CA, Belstrøm D, Twetman S, Tanner ACR. Oral microbial profiles of individuals with different levels of sugar intake. *J Oral Microbiol.* 2017; 9(1): 1355207.

137. Featherstone JD. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health*. 2006; 6(1) :S8.
138. Noor F, Tahir UI Qamar M, Ashfaq UA, Albutti A, Alwashmi ASS, Aljasir MA. Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; 15(5): 572.
139. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res*. 2019; 45(3): 243-63.
140. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological approaches to dental caries prevention: paradigm shift or shibboleth? *Caries Res*. 2018; 52(1-2): 153-65.
141. Newman DJ, Cragg GM. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Appl. Chem*. 2005; 77(1): 7-24.
142. Henrich CJ, Beutler JA. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. *Nat Prod Rep*. 2013; 30(10): 1284-98.
143. Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, com um banco de extratos de plantas brasileiros. [acesso 2022 Jan 18]. Disponível em: <https://nubbe.iq.unesp.br/portal/index.html>
144. Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 2018; 23(4): 762.
145. Cravens A, Payne J, Smolke CD. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 2142.
146. Harborne JB. Classes and functions of secondary products. In: Walton NJ, Brown DE. *Chemicals from plants: perspectives on secondary plant products*. London: Imperial College Press; 1999. p. 1-25.
147. Chinou I. Primary and secondary metabolites and their biological activity. In: Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. New York: CRC; 2008. p. 59-76.
148. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J Chromatogr A*. 2011; 1218(19): 2676-83.
149. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4(3): 206-2.
150. Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*. 2009; 325(5937): 161-5.
151. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*. 2015; 33(8): 1582-614.

152. Barnes EC, Kumar R, Davis RA. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. *Nat Prod Rep*. 2016; 33(3): 372-81.
153. Lawson ADG, MacCoss M, Heer JP. Importance of rigidity in designing small molecule drugs to tackle protein-protein interactions (ppis) through stabilization of desired conformers. *J Med Chem*. 2018; 61(10): 4283-9.
154. Ancuceanu R, Anghel AI, Ionescu C, Hovaneț MV, Cojocaru-Toma M, Dinu M. Clinical trials with herbal products for the prevention of dental caries and their quality: a scoping study. *Biomolecules*. 2019; 9(12): 884.
155. Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*. 2015; 20(4): 7329-58.
156. Philip N, Leishman S, Walsh L. Potential role for natural products in dental caries control. *Oral Health Prev Dent*. 2019; 17(5) :479-85.
157. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin Med*. 2019; 14: 11.
158. Labrecque J, Bodet C, Chandad F, Grenier D. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(2): 439-43.
159. Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Res*. 2010; 44(2): 116-26.
160. Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 257(1): 50-6.
161. Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *J Appl Microbiol*. 2007; 103(5): 1960-8.
162. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T et al. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans streptococci. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59(4): 968-73.
163. Touyz LZ, Amsel R. Anticariogenic effects of black tea (*Camellia sinensis*) in caries-prone rats. *Quintessence Int*. 2001; 32(8): 647-50.
164. Linke HA, LeGeros RZ. Black tea extract and dental caries formation in hamsters. *Int J Food Sci Nutr*. 2003; 54(1): 89-95.
165. Sasaki H, Matsumoto M, Tanaka T, Maeda M, Nakai M, Hamada S et al. Antibacterial activity of polyphenol components in oolong tea extract against *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 2004; 38(1): 2-8.

166. Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res.* 2006; 40(3): 265-70.
167. Yue JX, Yang HY, Han L, Zhu MY, Song FF, Huang C. Inhibitory effect of quercetin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2016; 51(6): 368-73.
168. Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 8189.
169. Zeng Y, Nikitkova A, Abdelsalam H, Li J, Xiao J. Activity of quercetin and kaempferol against *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch Oral Biol.* 2018; 98: 9-16.
170. Islam TH, Azad AHB, Akter S, Datta S. Antimicrobial activity of medicinal plants on *Streptococcus mutans*, a causing agent of dental caries. *J Eng Res Tech.* 2012; 1(10): 121-6.
171. Hasan S, Danishuddin M, Khan AU. Inhibitory effect of zingiber officinale towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. *BMC Microbiol.* 2015; 15(1): 1.
172. Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J.* 2002; 52(6): 433-7.
173. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(6): 389-92.
174. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(1): 61-4.
175. Zou L, Zhang L, Li J, Hao Y, Cheng L, Li W, Zhou X. Effect of *Galla chinensis* extract and chemical fractions on demineralization of bovine enamel in vitro. *J Dent.* 2008; 36(12): 999-1004.
176. Zhang LL, Xue J, Li JY, Zou L, Hao YQ, Zhou XD et al. Effects of *Galla chinensis* on inhibition of demineralization of regular bovine enamel or enamel disposed of organic matrix. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(9): 817-22.
177. Cheng L, ten Cate JM. Effect of *Galla chinensis* on the in vitro remineralization of advanced enamel lesions. *Int J Oral Sci.* 2010; 2(1): 15-20.
178. Wang RK, Zhao PP, Zhu Bing, Li JY. Inhibitive effect of extracts of *Galla chinensis* on caries development in rats. *J Sic Uni.* 2008; 39(3): 474-7.
179. Gabe V, Kacergius T, Abu-Lafi S, Kalesinskas P, Masalha M, Falah M et al. Inhibitory effects of ethyl gallate on *Streptococcus mutans* biofilm formation by optical profilometry and gene expression analysis. *Molecules.* 2019; 24(3): 529.

180. Gabe V, Zeidan M, Kacergius T, Bratchikov M, Falah M, Rayan A. Lauryl gallate activity and *streptococcus mutans*: its effects on biofilm formation, acidogenicity and gene expression. *Molecules*. 2020; 25(16): 3685.
181. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(5): 1302-9.
182. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and *tt-farnesol*. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(5): 782-9.
183. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA et al. Apigenin and *tt-farnesol* with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res*. 2005; 84(11): 1016-20.
184. Jeon JG, Pandit S, Xiao J, Grequire S, Falsetta ML, Klein MI et al. Influences of *trans-trans farnesol*, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on *Streptococcus mutans* physiology and survival within mixed-species oral biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011; 3(2): 98-106;
185. Sims KR Jr, Maceren JP, Liu Y, Rocha GR, Koo H, Benoit DSW. Dual antibacterial drug-loaded nanoparticles synergistically improve treatment of *Streptococcus mutans* biofilms. *Acta Biomater*. 2020; 115: 418-31.
186. Islam B, Khan SN, Haque I, Alam M, Mushfiq M, Khan AU. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62(4): 751-7.
187. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(7): 645-51.
188. Lee HJ, Park HS, Kim KH, Kwon TY, Hong SH. Effect of garlic on bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Angle Orthod*. 2011; 81(5): 895-900.
189. Malvania EA, Sharma AS, Sheth SA, Rathod S, Chovatia NR, Kachwala MS. in vitro analysis of licorice (*glycyrrhiza glabra*) root extract activity on *Streptococcus mutans* in comparison to chlorhexidine and fluoride mouthwash. *J Contemp Dent Pract*. 2019; 20(12): 1389-94.
190. Ambrosio SR, Furtado NA, de Oliveira DC, da Costa FB, Martins CH, de Carvalho TC et al. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2008; 63(5-6): 326-30.
191. Palhares RM, Drummond MG, Brasil BD, Cosenza GP, Brandão MD, Oliveira G. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS ONE*. 2015; 10(5): e0127866.

192. Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opin Ther Pat*. 2010; 20(5): 681-94.
193. Allaker RP, Douglas CW. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33(1): 8-13.
194. Rosas-Piñón Y, Mejía A, Díaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sánchez-Nieto S, Rivero-Cruz JF. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J Ethnopharmacol*. 2012; 141(3): 860-5.
195. Castillo Pedraza MC, de Oliveira Fratucelli ED, Ribeiro SM, Florez Salamanca EJ, da Silva Colin J, Klein MI. Modulation of lipoteichoic acids and exopolysaccharides prevents *Streptococcus mutans* biofilm accumulation. *Molecules*. 2020; 25(9): 2232.
196. Ferreira-Filho JCC, Marre ATO, de Sá Almeida JS, Lobo LA, Farah A, Romanos MTV et al. Therapeutic potential of *bauhinia forficata* link in dental biofilm treatment. *J Med Food*. 2020; 23(9): 998-1005.
197. Falsetta ML, Klein MI, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, Scott-Anne KK et al. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expression in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(12): 6201-11.
198. Nijampatnam B, Casals L, Zheng R, Wu H, Velu SE. Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016; 26(15): 3508-13.
199. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 564-82.
200. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.
201. Sims KR Jr, Maceren JP, Liu Y, Rocha GR, Koo H, Benoit DSW. Dual antibacterial drug-loaded nanoparticles synergistically improve treatment of *Streptococcus mutans* biofilms. *Acta Biomater*. 2020; 115: 418-31.
202. Horev B, Klein MI, Hwang G, Li Y, Kim D, Koo H, Benoit DS. pH-activated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano*. 2015; 9(3): 2390-404.
203. Zhou J, Horev B, Hwang G, Klein MI, Koo H, Benoit DS. Characterization and optimization of pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery to oral biofilms. *J Mater Chem B*. 2016; 4(18): 3075-85.
204. Roncari Rocha G, Sims KR Jr, Xiao B, Klein MI, Benoit DSW. Nanoparticle carrier co-delivery of complementary antibiofilm drugs abrogates dual species cariogenic biofilm formation in vitro. *J Oral Microbiol*. 2021; 14(1): 1997230.

205. Ribeiro SM, Fracucelli ÉDO, Fernandes JM, Bueno PCP, Cavaleiro AJ, Klein MI. Systematic approach to identify novel antimicrobial and antibiofilm molecules from plants' extracts and fractions to prevent dental caries. *J Vis Exp.* 202; (169).
206. Ameni AZ, Latorre OA, Torres LM, Górnaiak SL. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian unified health system (SUS). *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:9-13.
207. Marquete R; Mansano VF. O gênero *Casearia* Jacq. no Brasil. *Revista de Biologia Neotropical.* 2016; (1) 69-249.
208. Cavallari MM, Gimenes MA, Billot C, Torres RB, Cavaleiro AJ, Bouvet JM. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. *Ann Bot* 2010; 106(4): 627-36
209. Anhesine NB, Bueno PCP, Torres RB, Lopes NP, Cavaleiro AJ. Non-polar and polar chemical profiling of six *Casearia* species (Salicaceae). *Biochem Syst Ecol* 2019; 87: 103954.
210. Marmitt DJ, Bitencourt S, Silva AC, Rempel C, Goettert MI. Scientific production of plant species included in the Brazilian national list of medicinal plants of interest to the unified health system (RENISUS) from 2010 to 2013. *J Chem Pharm Sci* 2016; 8(2): 123-32.
211. ANAPYON Líquido Barueri: DM (HYPM) [acesso em 2022 jun 18]. Disponível em:  
<https://www.bulas.med.br/p/bulasdemedicamentos/bula/1939/anapyon+liquido.htm>
212. Laboratório Panizza Fitoterápico. [acesso em 2022 jun 18]. Disponível em:  
<http://www.conbrafito.org/Produtos/PopupCosmeticos.asp?IID=12038>
213. Extrato líquido de *Casearia sylvestris*. [acesso em 2022 jun 18]. Disponível em:  
[https://www.drogavegetal.com.br/produto/dv-guacatonga-casearia-sylvestris-extrato-fluido.html?utm\\_source=Site&utm\\_medium=GoogleMerchant&utm\\_campaign=GoogleMerchant&sku=47580-1](https://www.drogavegetal.com.br/produto/dv-guacatonga-casearia-sylvestris-extrato-fluido.html?utm_source=Site&utm_medium=GoogleMerchant&utm_campaign=GoogleMerchant&sku=47580-1).
214. Morita H, Nakayama M, Kojima H, Takeya K, Itokawa H, Schenkel EP et al. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem Pharm Bull.* 1991; 39(3): 693-7.
215. Oberlies NH, Burgess JP, Navarro HA, Pinos RE, Fairchild CR, Peterson RW et al. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J Nat Prod.* 2002; 65(2): 95-9.
216. Wang W, Ali Z, Li X, Smillie TA, Guo D, Khan IA. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. *Fitoterapia* 2009; 80(7): 404-7.

217. Santos AG, Ferreira PMP, Vieira JR GM, Perez CC, Tininis AG; Silva GH et al. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem Biodivers*. 2010; 7(1): 205-15.
218. Da Silva SL, Calgarotto AK, Chaar J, Marangoni S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Sw. aqueous extract with anti-Pla2 activity. *Toxicon*. 2008; 52(6): 655-66.
219. Da Silva SL, Chaar JS, Yano T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *C. sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). *Eur J Pharmacol*. 2009; 608(1-3): 76-83.
220. Bueno PCP, Passareli F, Anhesine NB, Torres RB, Cavalheiro AJ. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety *lingua* (Salicaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2016; 68: 23-6.
221. Eloff JN. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complement Altern Med*. 2019; 19(1): 106.
222. Little EL, Wadsworth FL. Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands. Washington: Department of Agriculture; 1964. p. 548
223. Passareli F. Preparação e caracterização de casearinas de *Casearia sylvestris* como padrão fitoquímico [dissertação de mestrado]. Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química; 2010.
224. Eloff JN. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. *Phytomedicine*. 2004; 11(4): 370-1.
225. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(1-2): 80-4.
226. Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Biol*. 2010; 666: 87-102.
227. Lobo CIV, Lopes ACUA, Klein MI. Compounds with distinct targets present diverse antimicrobial and antibiofilm efficacy against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and combinations of compounds potentiate their effect. *J Fungi (Basel)*. 2021; 7(5): 340.
228. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol*. 2010; 192(12): 3024-32.
229. Kim D, Sengupta A, Niepa TH, Lee BH, Weljie A, Freitas-Blanco VS et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. 2017; 7: 41332;
230. Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18(1): 61.

231. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28(3): 350-6.
232. Klein MI, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster TH, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilms development. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(3): 837-41.
233. Klein MI, Xiao J, Heydorn A, Koo H. An analytical tool-box for comprehensive biochemical, structural and transcriptome evaluation of oral biofilms mediated by mutans Streptococci. *J Vis Exp.* 2011; 25(47): e2512.
234. Lopes ACUA, Lobo CIV, Ribeiro SM, Colin JS, Constantino VCN, Canonice MM et al. Distinct agents induce *Streptococcus mutans* cells with altered biofilm formation capacity. *Microbiol Spectr.* 2022; 10(4): e0065022.
235. Zero D.T. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health.* 2006; 6(Suppl. S1): S9.
236. Paganelli FL, van de Kamer T, Brouwer EC, Leavis HL, Woodford N, Bonten MJ et al. Lipoteichoic acid synthesis inhibition in combination with antibiotics abrogates growth of multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(3): 355-63.
237. Richter SG, Elli D, Kim HK, Hendrickx AP, Sorg JA, Schneewind O et al. Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(9): 3531-6.
238. Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. *Braz Oral Res.* 2008; 22(3): 216-22.
239. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol.* 2012; 27(5): 350-61.
240. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gffB*, *gffC*, and *gfpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(6): 466-73.
241. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(3): 213-21.
242. Klein MI, Xiao J, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Koo H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45795.

243. Saputo S, Faustoferri RC, Quivey RG Jr. A drug repositioning approach reveals that *Streptococcus mutans* is susceptible to a diverse range of established antimicrobials and nonantibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 62(1): e01674-17.
244. Van Dijck P, Sjollema J, Cammue BP, Lagrou K, Berman J, d'Enfert C et al. Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microb. Cell.* 2018; 5(7): 300-26.
245. Marino MJ. The use and misuse of statistical methodologies in pharmacology research. *Biochem Pharmacol.* 2014; 87(1): 78-92.
246. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55(4): 611-22.
247. Chen H, Tan RX, Liu ZL, Zhang Y, Yang L. Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*. *J Nat Prod.* 1996; 59(7): 668-70.
248. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 16756885, caseargrewiin F. [acesso em 2022 Sept 13]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caseargrewiin-F>

## APÊNDICE A – RENDIMENTO, CONCENTRAÇÃO DE DILUENTES E PH DO EXTRATOS, FRAÇÕES E MOLÉCULAS DE *Casearia sylvestris*

**Quadro 1** - Rendimento dos Extratos brutos de *C. sylvestris* de amostras coletadas em Araraquara/SP e Brasília /DF

| Massa total de folhas e fruto secos e moídos (g) |                   |                    |                                    | 20             |
|--|-------------------|--------------------|------------------------------------|----------------|
| Indivíduo  | Morfologia        | Parte constituinte | Massa (mg) EB seco em concentrador | Rendimento (%) |
| ARA/SP   | <i>lingua</i>     | folha              | 200,8                              | 1              |
| ARA/SP   | <i>lingua</i>     | fruto              | 158,1                              | 0,79           |
| ARA/SP   | <i>sylvestris</i> | folha              | 200,2                              | 1,01           |
| ARA/SP   | intermediária     | folha              | 203,3                              | 1,01           |
| BRA/DF   | <i>lingua</i>     | folha              | 162,9                              | 0,81           |
| Massa total de folhas e fruto secos e moídos (g) |                   |                    |                                    | 20             |
| Indivíduo  | Morfologia        | Parte constituinte | Massa (mg) EB liofilizados         | Rendimento (%) |
| ARA/SP   | <i>lingua</i>     | folha              | 912,9                              | 4,56           |
| ARA/SP   | <i>lingua</i>     | fruto              | 1080,4                             | 5,4            |
| ARA/SP   | <i>sylvestris</i> | folha              | 1226,1                             | 6,1            |
| ARA/SP   | intermediária     | folha              | 1167,1                             | 5,8            |
| BRA/DF   | <i>lingua</i>     | folha              | 1175,4                             | 5,8            |

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 2** - Rendimento dos Extratos brutos de *C. sylvestris* de amostras coletadas em Presidente Venceslau/SP

|  |              |
|--|--------------|
| <b>Massa total de folhas secas e moídas (g)</b>  | <b>72,50</b> |
| Massa total de extrato bruto folhas (EBf) (g)    | 12,04        |
| Rendimento (%)                                   | 16,6         |
|  |              |
| <b>Massa total de galhos secos e moídos (g):</b> | <b>67,80</b> |
| Massa total de extrato bruto de galhos (EBg) (g) | 4,99         |
| Rendimento (%)                                   | 7,4          |

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 3** - Extratos brutos de *C. sylvestris* e suas respectivas concentrações nas Soluções Estoque e Soluções de Trabalho

| Indivíduo | Morfologia        | Parte Constituinte | Concentração da Solução Estoque | Concentração do Eluente na Solução Estoque | Concentração da Solução Trabalho | Concentração do Eluente na Solução Trabalho         |
|-----------|-------------------|--------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | Folhas             | 24 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 12 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | Frutos             | 24 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 12 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| ARA/SP    | <i>sylvestris</i> | Folhas             | 24 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 12 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| ARA/SP    | intermediária     | Folhas             | 24 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 12 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| BRA/DF    | <i>lingua</i>     | Folhas             | 24 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 12 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| PRE/SP    | <i>sylvestris</i> | Folhas             | 36 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 18 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| PRE/SP    | <i>sylvestris</i> | Galhos             | 36 mg/mL                        | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 18 mg/mL                         | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |

A solução estoque designa a solução concentrada, que foi diluída conforme indicado na tabela, fornecendo soluções de menor concentração designada de solução de trabalho. EtOH designa Etanol; DMSO designa dimetilsulfóxido e tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6,2.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 4** - Rendimento das frações de *C. sylvestris* obtidas pela metodologia 1

| Indivíduo | Morfologia        | Parte constituinte | Massa Extrato Bruto (mg) | Eluente   | Massa Fração (mg) | Rendimento (%) |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------------|-----------|-------------------|----------------|
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | folha              | 912,9                    | Hex/AcOEt | 0,2               | 0,02           |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 0,5               | 0,05           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 4,9               | 0,53           |
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | fruto              | 1080,4                   | Hex/AcOEt | 0,2               | 0,01           |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 36,1              | 3,34           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 14,2              | 1,31           |
| ARA/SP    | <i>sylvestris</i> | folha              | 1226,1                   | Hex/AcOEt | 0,1               | 0,01           |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 2,2               | 0,17           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 8,4               | 0,68           |
| ARA/SP    | intermediária     | folha              | 1167,1                   | Hex/AcOEt | 0                 | -              |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 1,2               | 0,10           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 1,2               | 0,10           |
| BRA/DF    | <i>lingua</i>     | folha              | 1175,4                   | Hex/AcOEt | 0,7               | 0,05           |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 6,9               | 0,58           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 4,4               | 1,64           |

Rendimento das frações obtidas através da metodologia 2. O rendimento (%) foi calculado baseado no peso (mg) dos extratos brutos de cada amostra.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 5** - Rendimento das frações de *C. sylvestris* obtidas pela metodologia 2

| Indivíduo | Morfologia        | Parte constituinte | Massa Extrato Bruto (mg) | Eluente   | Massa Fração (mg) | Rendimento (%) |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------------|-----------|-------------------|----------------|
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | folha              | 200,8                    | Hex/AcOEt | 34,4              | 17,13          |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 4                 | 1,99           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 12,2              | 6,07           |
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | fruto              | 158,1                    | Hex/AcOEt | 0,5               | 0,31           |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 1,9               | 1,20           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 3                 | 1,89           |
| ARA/SP    | <i>sylvestris</i> | folha              | 200,2                    | Hex/AcOEt | 1,4               | 0,69           |
|           |                   |                    |                          | AcOet     | 6,2               | 3,09           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 12,8              | 6,39           |
| ARA/SP    | intermediária     | folha              | 203,3                    | Hex/AcOEt | 0,6               | 0,29           |
|           |                   |                    |                          | AcOEt     | 7,8               | 3,83           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 15,5              | 7,62           |
| BRA/DF    | <i>lingua</i>     | folha              | 162,9                    | Hex/AcOEt | 1,6               | 0,98           |
|           |                   |                    |                          | AcOEt     | 2,5               | 1,53           |
|           |                   |                    |                          | EtOH      | 1,3               | 0,79           |

O rendimento (%) foi calculado baseado no peso (mg) dos extratos brutos de cada amostra.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 6** - Rendimento das frações de *C. sylvestris* obtidos em Presidente Venceslau/SP

| Massa de extratos brutos das folhas (mg) |                 | 1880       |                |
|--|-----------------|------------|----------------|
| Frações                                  | Eluente         | Massa (mg) | Rendimento (%) |
| 1  | Hex/AcOEt 95:05 | 24,3       | 1,29           |
| 2  | AcOEt           | 308,3      | 16,40          |
| 3  | EtOH            | 135,8      | 7,2            |
| Massa de extratos brutos dos galhos (mg) |                 | 1460       |                |
| Frações                                  | Eluente         | Massa (mg) | Rendimento (%) |
| 1  | Hex/AcOEt 95:05 | 18,7       | 1,28           |
| 2  | AcOEt           | 117,0      | 8,01           |
| 3  | EtOH            | 132,8      | 9,10           |

O rendimento (%) foi calculado baseado no peso (mg) dos extratos brutos de cada amostra.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 7** - Frações de *C. sylvestris* e suas respectivas concentrações nas Soluções Estoque e Soluções de Trabalho

| Indivíduo | Morfologia        | Parte constituinte | Eluente            | Concentração da Solução Estoque | Concentração do Eluente na Solução Estoque | Concentração da Solução Trabalho | Concentração do Eluente na Solução Trabalho         |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| ARA/SP    | <i>lingua</i>     | Folhas e Frutos    | Hexano/AcOEt 95:05 | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | AcOEt              | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | EtOH               | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| ARA/SP    | <i>sylvestris</i> | Folhas             | Hexano/AcOEt 95:05 | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | AcOEt              | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | EtOH               | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| ARA/SP    | intermediária     | Folhas             | Hexano/AcOEt 95:05 | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | AcOEt              | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | EtOH               | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |

**Continua**

| Indivíduo | Morfologia        | Parte constituinte | Eluente               | Concentração da Solução Estoque | Concentração do Eluente na Solução Estoque | Concentração da Solução Trabalho | Concentração do Eluente na Solução Trabalho                               |
|-----------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| BRA/SP    | <i>lingua</i>     | Folhas             | Hexano/AcOEt<br>95:05 | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | <b>Continuação</b><br>42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                   |                    | AcOEt                 | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2                       |
|           |                   |                    | EtOH                  | 4 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 2 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2                       |
| PRE/SP    | <i>sylvestris</i> | Folhas e Galhos    | Hexano/AcOEt<br>95:05 | 8 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 4 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2                       |
|           |                   |                    | AcOEt                 | 8 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 4 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2                       |
|           |                   |                    | EtOH                  | 8 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 4 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2                       |

A solução estoque designa a solução concentrada, que foi diluída conforme indicado na tabela, fornecendo soluções de menor concentração designada de solução de trabalho. EtOH designa Etanol; DMSO designa dimetilsulfóxido e tampão fosfato tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6,2.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 8** - Rendimento das frações EFS-C18 de *C. sylvestris* obtidos em Presidente Venceslau/SP

| Amostras | Frações | Eluente         | Massa (mg) | Rendimento (%) |
|----------|---------|-----------------|------------|----------------|
| Folhas   | F4.1b   | Água/EtOH 95:05 | 1540,2     | 54,4           |
|          | F4.2b   | Água/EtOH 60:40 | 15,5       | 0,5            |
|          | F4.3b   | Água/EtOH 40:60 | 77,4       | 2,7            |
|          | F4.4b   | Água/EtOH 20:80 | 183,7      | 6,5            |
|          | F4.5b   | EtOH            | 71,5       | 2,5            |
| Galhos   | G3.1a   | Água/EtOH 95:05 | 1240,1     | 51,5           |
|          | G3.2a   | Água/EtOH 60:40 | 138,9      | 5,8            |
|          | G3.3a   | Água/EtOH 40:60 | 64,9       | 2,7            |
|          | G3.4a   | Água/EtOH 20:80 | 83,5       | 3,5            |
|          | G3.5a   | EtOH            | 54,6       | 2,3            |

O rendimento (%) foi calculado baseado no peso (mg) dos extratos brutos de cada amostra.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 9** - Frações EFS-C18 de *C. sylvestris* e suas respectivas concentrações nas Soluções Estoque e Soluções de Trabalho

| Indivíduo | Parte constituinte | Eluente                 | Concentração da Solução Estoque | Concentração do Eluente na Solução Estoque | Concentração da Solução Trabalho | Concentração do Eluente na Solução Trabalho         |
|-----------|--------------------|-------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| PRE/SP    | Folhas             | Água/EtOH 95:05 (F4.1b) | 8 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 4 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                    | Água/EtOH 60:40 (F4.2b) | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2              |
|           |                    | Água/EtOH 40:60 (F4.3b) | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2              |
|           |                    | Água/EtOH 20:80 (F4.4b) | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2              |
|           |                    | EtOH (F4.5b)            | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2              |

**Continua**

| Indivíduo | Parte constituinte | Eluente                    | Concentração da Solução Estoque | Concentração do Eluente na Solução Estoque | Concentração da Solução Trabalho | Concentração do Eluente na Solução Trabalho                               |
|-----------|--------------------|----------------------------|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| PRE/SP    | Galhos             | Água/EtOH 95:05<br>(G3.1a) | 8 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 4 mg/mL                          | <b>Continuação</b><br>42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
|           |                    | Água/EtOH 60:40<br>(G3.2a) | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2                                    |
|           |                    | Água/EtOH 40:60<br>(G3.3a) | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2                                    |
|           |                    | Água/EtOH 20:80<br>(G3.4a) | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2                                    |
|           |                    | EtOH<br>(G3.5a)            | 9,4 mg/mL                       | 99% EtOH                                   | 4,55 mg/mL                       | 49,5% EtOH e 50% tampão fosfato pH 6,2                                    |

A solução estoque designa a solução concentrada, que foi diluída conforme indicado na tabela, fornecendo soluções de menor concentração designada de solução de trabalho. EtOH designa Etanol; DMSO designa dimetilsulfóxido e tampão fosfato tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6,2.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 10** - Valores do pH dos extratos brutos de *C. sylvestris*

| Indivíduo     | Morfologia               | Parte Constituinte | Concentração da Solução Trabalho | Valor do pH quando diluído (1:1) em tampão fosfato 2,5 mM, pH 6,2 | Valor do pH quando diluído (1:1) em tampão fosfato 2,5 mM, pH 6,8 |
|---------------|--------------------------|--------------------|----------------------------------|---|---|
| ARA/SP        | <i>lingua</i>            | folha              | 12 mg/mL                         | 6,996   | -   |
| ARA/SP        | <i>lingua</i>            | fruto              | 12 mg/mL                         | 7,064   | -   |
| <b>ARA/SP</b> | <b><i>sylvestris</i></b> | <b>folha</b>       | <b>12 mg/mL</b>                  | <b>6,852</b>  | <b>7,101</b>  |
| <b>ARA/SP</b> | <b>intermediária</b>     | <b>folha</b>       | <b>12 mg/mL</b>                  | <b>6,527</b>  | <b>7,03</b>   |
| <b>BRA/DF</b> | <b><i>lingua</i></b>     | <b>folha</b>       | <b>12 mg/mL</b>                  | <b>6,515</b>  | <b>7,076</b>  |
| PRE/SP        | <i>sylvestris</i>        | folha              | 18 mg/mL                         | 6.882   | -   |
| PRE/SP        | <i>sylvestris</i>        | galho              | 18 mg/mL                         | 6.945   | -   |
| Veículo       |                          | -                  |                                  | 7,039   | -   |

Para verificar o pH de cada extrato e veículo (sem microrganismo) as soluções estoque foram diluídas 1:1 em tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6,2) e em seguida, adicionadas em tubos de vidro contendo meio TY + 1% sacarose (concentração dos extratos 500 µg/mL). O pH foi aferido usando um pHmetro digital. Os extratos brutos com diferença de 0,2 de pH vs veículo (em verde) foram ajustados através da diluição em tampão fosfato tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6,8.

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 11 - Valores do pH das frações de *C. sylvestris*

| Indivíduo           | Morfologia        | Parte constituinte | Fração (Eluente) | Concentração da Solução Trabalho | Valor do pH quando diluído (1:1) em tampão fosfato a 2,5 mM pH 6.2 |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|--|
| ARA/SP <sup>1</sup> | <i>lingua</i>     | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | -  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 6,801  |
| ARA/SP <sup>1</sup> | <i>lingua</i>     | fruto              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 6,942  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 7,011  |
| ARA/SP <sup>1</sup> | <i>sylvestris</i> | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | -  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 7,246  |
| ARA/SP <sup>1</sup> | intermediária     | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | -  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | -  |
| BRA/DF <sup>1</sup> | <i>lingua</i>     | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 7,104  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 7,081  |
| ARA/SP <sup>2</sup> | <i>lingua</i>     | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | 6,832  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 7,045  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 6,823  |
| ARA/SP <sup>2</sup> | <i>lingua</i>     | fruto              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 6,801  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 6,913  |
| ARA/SP <sup>2</sup> | <i>sylvestris</i> | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 2 mg/mL                          | -  |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 6,824  |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 7  |

Continua

| Indivíduo           | Morfologia        | Parte constituinte | Fração (Eluente) | Concentração da Solução Trabalho | Valor do pH quando diluído (1:1) em tampão fosfato 2,5 mM, pH 6.2 |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|---|
| PRE/SP <sup>2</sup> | <i>sylvestris</i> | folha              | Hex/AcOEt 95:05  | 4 mg/mL                          | <b>Continuação</b><br>6,894                                       |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 6,994   |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 7,004   |
| PRE/SP <sup>2</sup> | <i>sylvestris</i> | galho              | Hex/AcOEt 95:05  | 4 mg/mL                          | 7,087   |
|                     |                   |                    | AcOEt            |                                  | 7,053   |
|                     |                   |                    | EtOH             |                                  | 7,046   |

Para verificar o pH de cada fração e veículo (sem microrganismo) as soluções estoque foram diluídas 1:1 em tampão fosfato a 2,5 mM (pH 6,2) e em seguida, adicionadas em tubos de vidro contendo meio TY + 1% sacarose (concentração das frações 250 µg/mL). O pH foi aferido usando um pHmetro digital. Para as frações, devido ao baixo rendimento, não foi possível mensurar o pH de todas as amostras. <sup>1</sup>Amostras obtidas de extratos brutos liofilizados e após, secas em concentrador de amostras. <sup>2</sup>Amostras obtidas de extratos brutos secos em concentrador de amostras e após, as frações foram secas em capela de exaustão.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 12** - Moléculas isoladas de *C. sylvestris* e suas respectivas concentrações nas Soluções Estoque e Trabalho

| Composto   | Concentração da Solução Estoque | Concentração do Eluente na Solução Estoque | Concentração da Solução Trabalho | Concentração do Eluente na Solução Trabalho         |
|--|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| Flavonóide 4 (Quercetin-3-O-rutinoside - Rutina) | 2 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 1 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,2 |
| Caseargrewiina F                                 | 2 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 1 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,3 |
| Casearina X                                      | 2 mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 1 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,4 |
| Casearina J                                      | 52mg/mL                         | 84,15% EtOH e 15% DMSO                     | 1 mg/mL                          | 42,075% EtOH, 7,5% DMSO e 50% tampão fosfato pH 6,5 |

A solução estoque designa a solução concentrada, que foi diluída conforme indicado na tabela, fornecendo soluções de menor concentração designada de solução de trabalho. EtOH designa Etanol; DMSO designa dimetilsulfóxido tampão fosfato, tampão fosfato tampão fosfato a 2,5 mM, pH 6,2.

Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE B - MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR DAS CULTURAS DE *S. mutans* TRATADAS POR DIFERENTES AGENTES

**Quadro 1** - Média da viabilidade celular ( $\log_{10}$ UFC/mL) das culturas de *S. mutans* tratadas por diferentes agentes

| Inóculo      | CHX<br>0,12% | C135<br>250 µg/mL | V<br>10<br>min | AcOET_<br>BRA/DF 250<br>µg/mL | tt- farnesol<br>125 µg/mL | V<br>1 h | CsF<br>125 µg/mL | V<br>4 h | NaF<br>250 ppm | Composto<br>1771<br>7,812 µg/mL | Miricetina<br>(J105951)<br>500 µg/mL | V<br>6 h |      |
|--------------|--------------|-------------------|----------------|-------------------------------|---------------------------|----------|------------------|----------|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------|------|
|              | 9,45         | 5,83              | 6,18           | 9,11                          | 7,56                      | 6,87     | 9,08             | 7,45     | 8,29           | 8,91                            | 8,22                                 | 6,94     | 8,33 |
|              | 9,41         | 5,98              | 6,31           | 9,18                          | 7,48                      | 6,83     | 9,12             | 7,39     | 8,34           | 8,86                            | 8,21                                 | 7,09     | 8,29 |
| <b>Média</b> | 9,43         | 5,91              | 6,25           | 9,14                          | 7,52                      | 6,85     | 9,10             | 7,42     | 8,32           | 8,89                            | 8,22                                 | 7,02     | 8,31 |

Média da viabilidade celular ( $\log_{10}$ UFC/mL) das culturas de *S. mutans* após tratadas por diferentes agentes e os respectivos tempos de exposição aos tratamentos. Dados de 1 ocasião experimental. O controle veículo é representado como V para cada tempo de incubação.

Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE C - DADOS DAS LEITURAS (260 nm) E ELETROFORESE EM GEL DO RNA DURANTE AS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA

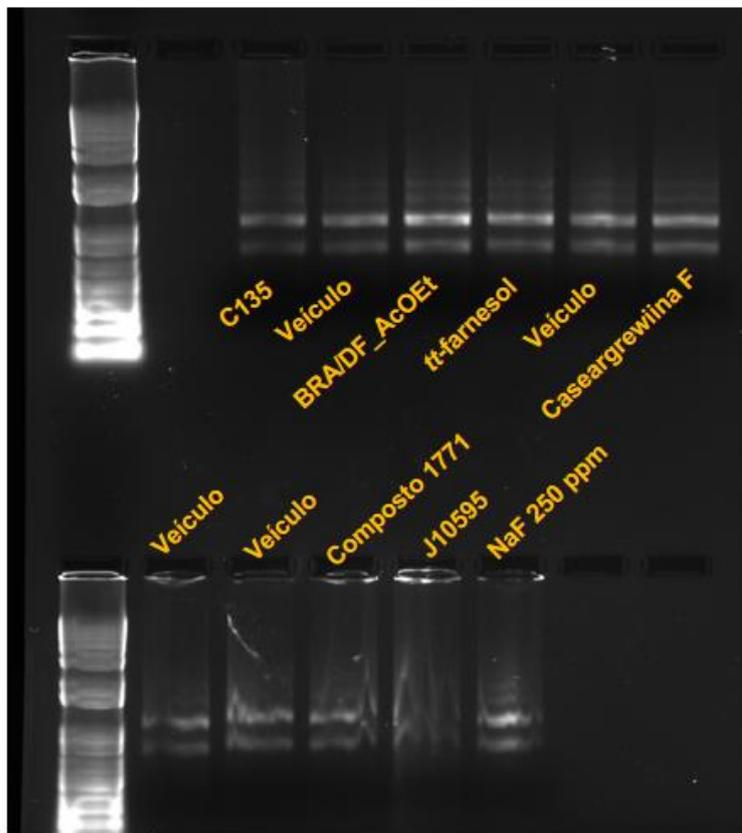


Imagem obtida através do equipamento BIO RAD Molecular Image Gel Doc™XR+ with Image Lab Software. Nota-se integridade das bandas correspondentes à RNA ribossomal para todas as amostras em todos os grupos. Observa-se também ausência de DNA. V designa o controle veículo.

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 1 - Primeira leitura do RNA "bruto" (sem purificação)

| Incubação | Agente              | Amostra     | ng/ $\mu$ L    |           |                | Rendimento ( $\mu$ g) | 260/280     |           |           |             |
|-----------|---------------------|-------------|----------------|-----------|----------------|-----------------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
|           |                     |             | Leitura 1      | Leitura 2 | Média          |                       | Leitura 1   | Leitura 2 | Leitura 3 | Média       |
| 10 min    | V                   | RNA1        | 111,721        |           | 111,721        | <b>10,84</b>          | 2,08        |           |           | 2,08        |
|           | CHX                 | RNA2        | 258,81         |           | 258,81         | <b>22,00</b>          | 2,03        |           |           | 2,03        |
|           | C135                | RNA3        | 146,735        |           | 146,735        | <b>12,47</b>          | 2,08        |           |           | 2,08        |
| 1 hora    | <b>V</b>            | <b>RNA4</b> | <b>251,776</b> |           | <b>251,776</b> | <b>21,40</b>          | <b>2,05</b> |           |           | <b>2,05</b> |
|           | <b>BRA/AcOEt</b>    | <b>RNA5</b> | <b>389,506</b> |           | <b>389,506</b> | <b>33,11</b>          | <b>2,09</b> |           |           | <b>2,09</b> |
|           | <i>tt</i> -farnesol | RNA6        | 314,907        |           | 314,907        | <b>26,77</b>          | 2,07        |           |           | 2,07        |
| 4 horas   | <b>V</b>            | <b>RNA7</b> | <b>213,568</b> |           | <b>213,568</b> | <b>18,15</b>          | <b>2,1</b>  |           |           | <b>2,1</b>  |
|           | <b>CsF</b>          | <b>RNA8</b> | <b>104,757</b> |           | <b>104,757</b> | <b>8,90</b>           | <b>2,05</b> |           |           | <b>2,05</b> |
| 6 horas   | V                   | RNA9        | 149,564        |           | 149,564        | <b>12,71</b>          | 2,11        |           |           | 2,11        |
|           | 1771                | RNA10       | 92,418         | 102,193   | 97,3055        | <b>8,27</b>           | 1,89        | 2,04      | 2,04      | 1,99        |
|           | J10595              | RNA11       | 153,143        |           | 153,143        | <b>13,02</b>          | 2,12        |           |           | 2,12        |
|           | Flúor               | RNA12       | 245,811        |           | 245,811        | <b>20,89</b>          | 2,09        |           |           | 2,09        |

O rendimento determinou o protocolo de purificação e a mesmo foi realizada com o RNeasy Micro Kit.

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 2** - Valores de leitura (260 nm) da primeira etapa de purificação de RNA (DNase I na coluna) e cálculo para a segunda etapa de purificação (DNase em solução)

| Amostra | ng/ $\mu$ L |           |         | Rendimento ( $\mu$ g) | 260/280   |           |       | Tratamento com Turbo DNase (2 $\mu$ l de enzima / 10 $\mu$ g de RNA) |            |                       |
|---------|-------------|-----------|---------|-----------------------|-----------|-----------|-------|--|------------|-----------------------|
|         | Leitura 1   | Leitura 2 | Média   |                       | Leitura 1 | Leitura 2 | média | Enzima ( $\mu$ l)  | 10X Buffer | Água para 100 $\mu$ l |
| RNA1    | 438,868     |           | 438,868 | <b>7,24</b>           | 2,13      |           | 2,13  | 1,4  | 10         | 72,1                  |
| RNA2    | 9,356       | 9,679     | 9,5175  | <b>0,16</b>           | 2,7       | 2,36      | 2,53  | 0,03   | 10         | 73,0                  |
| RNA3    | 546,452     |           | 546,452 | <b>9,29</b>           | 2,17      |           | 2,17  | 1,9  | 10         | 71,1                  |
| RNA4    | 982,338     |           | 982,338 | <b>16,70</b>          | 2,18      |           | 2,18  | 3,3  | 10         | 69,7                  |
| RNA5    | 1527,73     |           | 1527,73 | <b>25,97</b>          | 2,15      |           | 2,15  | 5,2  | 10         | 67,8                  |
| RNA6    | 1052,647    |           | 1052,65 | <b>17,89</b>          | 2,2       |           | 2,2   | 3,6  | 10         | 69,4                  |
| RNA7    | 593,038     |           | 593,038 | <b>10,08</b>          | 2,16      |           | 2,16  | 2,0  | 10         | 71,0                  |
| RNA8    | 397,703     |           | 397,703 | <b>6,76</b>           | 2,12      |           | 2,12  | 1,4  | 10         | 71,6                  |
| RNA9    | 535,764     |           | 535,764 | <b>9,11</b>           | 2,14      |           | 2,14  | 1,8  | 10         | 71,2                  |
| RNA10   | 491,453     |           | 491,453 | <b>8,35</b>           | 2,14      |           | 2,14  | 1,7  | 10         | 71,3                  |
| RNA11   | 450,774     |           | 450,774 | <b>7,66</b>           | 2,13      |           | 2,13  | 1,5  | 10         | 71,5                  |
| RNA12   | 942,933     |           | 942,933 | <b>16,03</b>          | 2,15      |           | 2,15  | 3,2  | 10         | 69,8                  |

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 3** - Valores de leitura (260 nm) da quantidade de RNA da segunda etapa de purificação (após Turbo DNase II e limpeza em coluna)

| Amostra | ng/ $\mu$ L | Leitura 2 | Média   | Rendimento ( $\mu$ g) | 260/280   | Leitura 2 | Média |
|---------|-------------|-----------|---------|-----------------------|-----------|-----------|-------|
|         | Leitura 1   |           |         |                       | Leitura 1 |           |       |
| RNA1    | 208,247     | 207,293   | 207,77  | <b>3,64</b>           | 2,16      | 2,16      | 2,16  |
| RNA2    | 3,324       | 3,152     | 3,24    | <b>0,06</b>           | 2,01      | 2,27      | 2,14  |
| RNA3    | 493,086     | 476,557   | 484,82  | <b>8,48</b>           | 2,14      | 2,16      | 2,15  |
| RNA4    | 685,829     | 691,237   | 688,53  | <b>12,05</b>          | 2,21      | 2,23      | 2,22  |
| RNA5    | 1176,741    | 1077,165  | 1126,95 | <b>19,72</b>          | 2,24      | 2,24      | 2,24  |
| RNA6    | 779,642     | 785,453   | 782,55  | <b>13,69</b>          | 2,25      | 2,23      | 2,24  |
| RNA7    | 416,843     | 414,707   | 415,78  | <b>7,28</b>           | 2,12      | 2,13      | 2,125 |
| RNA8    | 416,574     | 413,698   | 415,14  | <b>7,26</b>           | 2,13      | 2,14      | 2,135 |
| RNA9    | 453,846     | 458,671   | 456,26  | <b>7,98</b>           | 2,13      | 2,11      | 2,12  |
| RNA10   | 340,046     | 338,608   | 339,33  | <b>5,94</b>           | 2,11      | 2,11      | 2,11  |
| RNA11   | 304,138     | 289,131   | 296,63  | <b>5,19</b>           | 2,12      | 2,13      | 2,125 |
| RNA12   | 657,108     | 673,62    | 665,36  | <b>11,64</b>          | 2,18      | 2,21      | 2,195 |

Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 4** - Diluição de RNA para 200 ng/ $\mu$ L

| Amostra     | RNA $\mu$ l   | Água $\mu$ l   | Total $\mu$ l |
|-------------|---------------|----------------|---------------|
| RNA1        | 14,44         | 0,56           | 15            |
| <b>RNA2</b> | <b>926,50</b> | <b>-911,50</b> | <b>15</b>     |
| RNA3        | 6,19          | 8,81           | 15            |
| RNA4        | 4,36          | 10,64          | 15            |
| RNA5        | 2,66          | 12,34          | 15            |
| RNA6        | 3,83          | 11,17          | 15            |
| RNA7        | 7,22          | 7,78           | 15            |
| RNA8        | 7,23          | 7,77           | 15            |
| RNA9        | 6,58          | 8,42           | 15            |
| RNA10       | 8,84          | 6,16           | 15            |
| RNA11       | 10,11         | 4,89           | 15            |
| RNA12       | 4,51          | 10,49          | 15            |

A amostra RNA2 não foi incluída nas análises de expressão gênica por RT-qPCR ou RNAseq.

Fonte: Elaboração própria.

## APÊNDICE D - MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM BIOFILMES PRÉ- FORMADOS (24H)

Quadro 1 - Média e desvio padrão para atividade antibiofilme de frações obtidas pela metodologia 1

|              | ARA<br><i>lingua-folha</i><br>(Hex) | ARA<br><i>lingua-folha</i><br>(AcOEt) | ARA<br><i>lingua-folha</i><br>(EtOH) | ARA<br><i>lingua-fruto</i><br>(Hex) | ARA<br><i>sylvestris</i><br>(Hex) | ARA<br><i>sylvestris</i><br>(EtOH) | ARA<br>intermediária<br>(EtOH) | BRA<br><i>lingua</i><br>(Hex) | V                      | Sm                     |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| UFC/mL       | 1,94 x 10 <sup>7</sup>              | 8,50 x 10 <sup>6</sup>                | 1,05 x 10 <sup>7</sup>               | 1,30 x 10 <sup>7</sup>              | 1,50E x 10 <sup>7</sup>           | 1,42 x 10 <sup>7</sup>             | 2,39 x 10 <sup>7</sup>         | 1,41 x 10 <sup>7</sup>        | 2,60 x 10 <sup>7</sup> | 1,08 x 10 <sup>7</sup> |
|              | 1,80 x 10 <sup>7</sup>              | 1,00 x 10 <sup>7</sup>                | 9,70 x 10 <sup>6</sup>               | 1,40 x 10 <sup>7</sup>              | 1,40 x 10 <sup>7</sup>            | 1,25 x 10 <sup>7</sup>             | 1,86 x 10 <sup>7</sup>         | 1,54 x 10 <sup>7</sup>        | 3,10 x 10 <sup>7</sup> | 1,25 x 10 <sup>7</sup> |
|              | 1,54 x 10 <sup>7</sup>              | 5,00 x 10 <sup>5</sup>                | 1,12 x 10 <sup>7</sup>               | 9,00 x 10 <sup>6</sup>              | 1,18 x 10 <sup>7</sup>            | 1,40 x 10 <sup>7</sup>             | 1,65 x 10 <sup>7</sup>         | 1,37 x 10 <sup>7</sup>        | 2,70 x 10 <sup>7</sup> | 1,62 x 10 <sup>7</sup> |
|              | 1,63 x 10 <sup>7</sup>              | 4,00 x 10 <sup>5</sup>                | 1,30 x 10 <sup>7</sup>               | 9,90 x 10 <sup>6</sup>              | 1,05E x 10 <sup>7</sup>           | 1,54 x 10 <sup>7</sup>             | 1,63 x 10 <sup>7</sup>         | 1,18 x 10 <sup>7</sup>        | 2,60 x 10 <sup>7</sup> | 1,39 x 10 <sup>7</sup> |
|              | -                                   | 1,18 x 10 <sup>7</sup>                | 1,05 x 10 <sup>7</sup>               | 1,22 x 10 <sup>7</sup>              | -                                 | 1,69 x 10 <sup>7</sup>             | 1,80 x 10 <sup>7</sup>         | 1,82 x 10 <sup>7</sup>        | 5,10 x 10 <sup>7</sup> | 1,42 x 10 <sup>7</sup> |
|              | -                                   | 1,28 x 10 <sup>7</sup>                | 1,12 x 10 <sup>7</sup>               | 1,36 x 10 <sup>7</sup>              | -                                 | 1,72 x 10 <sup>7</sup>             | 1,67E x 10 <sup>7</sup>        | 1,79 x 10 <sup>7</sup>        | 6,20 x 10 <sup>7</sup> | 1,39 x 10 <sup>7</sup> |
| <b>Média</b> | 1,73 x 10 <sup>7</sup>              | 7,33 x 10 <sup>6</sup>                | 1,10 x 10 <sup>7</sup>               | 1,20 x 10 <sup>7</sup>              | 1,28 x 10 <sup>7</sup>            | 1,50 x 10 <sup>7</sup>             | 1,83 x 10 <sup>7</sup>         | 1,52 x 10 <sup>7</sup>        | 3,72 x 10 <sup>7</sup> | 1,36 x 10 <sup>7</sup> |
| <b>DP</b>    | 1,78 x 10 <sup>6</sup>              | 5,53 x 10 <sup>6</sup>                | 1,12 x 10 <sup>6</sup>               | 2,05 x 10 <sup>6</sup>              | 2,05 x 10 <sup>6</sup>            | 1,82 x 10 <sup>6</sup>             | 2,88 x 10 <sup>6</sup>         | 2,50 x 10 <sup>6</sup>        | 1,55 x 10 <sup>6</sup> | 1,81 x 10 <sup>6</sup> |
| <b>%CV</b>   | 10,31                               | 75,45                                 | 10,16                                | 17,15                               | 15,96                             | 12,08                              | 15,68                          | 16,49                         | 41,66                  | 13,31                  |

Estas frações foram preparadas através do fracionamento de extratos liofilizados e secas no concentrador de amostras. Média e Desvio Padrão de UFC/mL dos biofilmes tratados por frações obtidas de extratos liofilizados e secas em concentrador de amostra. Dados de 1 ocasião experimental. O controle de crescimento (sem tratamento) é representado como Sm para *S. mutans*. DP denota desvio padrão e %CV denota coeficiente de variação.

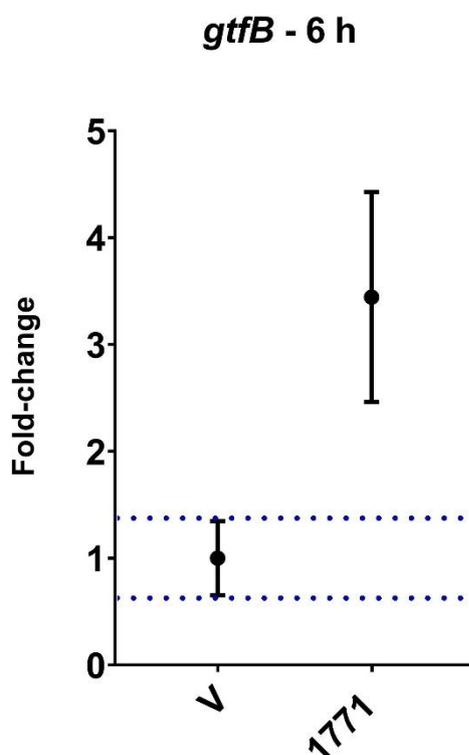
Fonte: Elaboração própria.

**Quadro 2** - Média e desvio padrão para atividade antibiofilme de frações obtidas pela metodologia 2

|               | <b>ARA<br/>lingua<br/>folha<br/>(Hex)</b> | <b>ARA<br/>lingua<br/>folha<br/>(AcOEt)</b> | <b>ARA<br/>lingua<br/>folha<br/>(EtOH)</b> | <b>ARA<br/>lingua<br/>fruto<br/>(Hex)</b> | <b>ARA<br/>sylvestris<br/>(Hex)</b> | <b>ARA<br/>sylvestris<br/>(EtOH)</b> | <b>ARA<br/>intermediária<br/>(Hex)</b> | <b>ARA<br/>intermediária<br/>(EtOH)</b> | <b>BRA<br/>lingua<br/>(Hex)</b> | <b>V</b>                | <b>Sm</b>              |
|---------------|---|---|--|---|-------------------------------------|--------------------------------------|--|---|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>UFC/mL</b> | 2,40 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,54 x 10 <sup>7</sup>                      | 3,10 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,60 x 10 <sup>7</sup>                    | 5,60 x 10 <sup>6</sup>              | 8,20 x 10 <sup>6</sup>               | 4,20 x 10 <sup>6</sup>                 | 2,30 x 10 <sup>5</sup>                  | 8,80 x 10 <sup>6</sup>          | 2,00 x 10 <sup>5</sup>  | 2,00 x 10 <sup>5</sup> |
|               | 2,00 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,62 x 10 <sup>7</sup>                      | 3,30 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,70 x 10 <sup>7</sup>                    | 6,10 x 10 <sup>6</sup>              | 8,70 x 10 <sup>6</sup>               | 3,70 x 10 <sup>6</sup>                 | 1,60 x 10 <sup>5</sup>                  | 7,90 x 10 <sup>6</sup>          | 4,00 x 10 <sup>5</sup>  | 3,00 x 10 <sup>5</sup> |
|               | 2,10 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,11 x 10 <sup>7</sup>                      | 3,10 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,70 x 10 <sup>7</sup>                    | 2,60 x 10 <sup>6</sup>              | 7,40 x 10 <sup>6</sup>               | 5,00 x 10 <sup>6</sup>                 | 4,20 x 10 <sup>5</sup>                  | 7,70 x 10 <sup>6</sup>          | 1,35 x 10 <sup>7</sup>  | 1,00 x 10 <sup>7</sup> |
|               | 3,10 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,19 x 10 <sup>7</sup>                      | 3,60 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,30 x 10 <sup>7</sup>                    | 3,30 x 10 <sup>6</sup>              | 8,30 x 10 <sup>6</sup>               | 4,40 x 10 <sup>6</sup>                 | 4,40 x 10 <sup>5</sup>                  | 9,20 x 10 <sup>6</sup>          | 1,06 x 10 <sup>7</sup>  | 1,29 x 10 <sup>7</sup> |
|               | 2,30 x 10 <sup>7</sup>                    | 8,50 x 10 <sup>6</sup>                      | 2,60 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,70 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,23 x 10 <sup>7</sup>              | 2,00 x 10 <sup>6</sup>               | 4,80 x 10 <sup>6</sup>                 | 6,10 x 10 <sup>6</sup>                  | 9,50 x 10 <sup>6</sup>          | 1,31 x 10 <sup>7</sup>  | 1,22 x 10 <sup>7</sup> |
|               | 2,40 x 10 <sup>7</sup>                    | 7,80 x 10 <sup>6</sup>                      | 2,10 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,20 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,86 x 10 <sup>7</sup>              | 2,20 x 10 <sup>6</sup>               | 4,90 x 10 <sup>6</sup>                 | 6,40 x 10 <sup>6</sup>                  | 8,40 x 10 <sup>6</sup>          | 1,24E x 10 <sup>7</sup> | 1,19 x 10 <sup>7</sup> |
| <b>Média</b>  | 2,38 x 10 <sup>7</sup>                    | 1,18 x 10 <sup>7</sup>                      | 2,97 x 10 <sup>6</sup>                     | 1,53 x 10 <sup>7</sup>                    | 8,08 x 10 <sup>6</sup>              | 6,13 x 10 <sup>6</sup>               | 4,50 x 10 <sup>6</sup>                 | 2,29 x 10 <sup>6</sup>                  | 8,58 x 10 <sup>6</sup>          | 9,61 x 10 <sup>6</sup>  | 7,57 x 10 <sup>6</sup> |
| <b>DP</b>     | 3,87 x 10 <sup>6</sup>                    | 3,46 x 10 <sup>6</sup>                      | 5,35 x 10 <sup>5</sup>                     | 2,25 x 10 <sup>6</sup>                    | 6,19 x 10 <sup>6</sup>              | 3,15 x 10 <sup>6</sup>               | 4,76 x 10 <sup>5</sup>                 | 3,07 x 10 <sup>6</sup>                  | 7,14 x 10 <sup>5</sup>          | 5,81 x 10 <sup>6</sup>  | 5,66 x 10 <sup>6</sup> |
| <b>%CV</b>    | 16,23                                     | 29,24                                       | 18,05                                      | 14,68                                     | 76,55                               | 51,41                                | 10,59                                  | 133,94                                  | 8,32                            | 60,52                   | 74,81                  |

Estas frações foram preparadas através do fracionamento de extratos secos no concentrador de amostras e secas em capela de exaustão. Média e Desvio Padrão log<sub>10</sub>UFC dos biofilmes tratados por frações obtidas de extratos liofilizados e secas em concentrador de amostra. Dados de 1 ocasião experimental. O controle de crescimento (sem tratamento) é representado como Sm para *S. mutans*. DP denota desvio padrão e %CV denota coeficiente de variação.

Fonte: Elaboração própria.

APÊNDICE E - EXPRESSÃO DE *gtfB* EM CULTURAS PLANCTÔNICAS DE *S. mutans*Figura 1 - Expressão de *gtfB* em culturas planctônicas de *S. mutans*

Os dados do tratamento 1771 foram comparados com o controle do veículo. As barras de erro e as linhas pontilhadas indicam intervalos de confiança de 95%. O controle veículo está representado por V (concentração 5.26% EtOH and 0.94% DMSO). O experimento realizado em 1 ocasião experimental e a quantificação de expressão por qPCR em triplicata.

Fonte: Elaboração própria.

**ANEXO A – CERTIFICADO SISGEN**

Cadastro SisGen para atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA-Cadastro nº A00892A.



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A00892A**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A00892A**  
Usuário: **UNESP**  
CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**  
Finalidade do Acesso:  
 **Pesquisa Científica**       **Bioprospecção**       **Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Casearia sylvestris**  
**Casearia decandra**  
**Casearia gossypiosperma**  
**Casearia obliqua**  
**Casearia rupestris**  
**Casearia lasiophylla**  
**Casearia sylvestris**

**Fonte do CTA**

**CTA de origem não identificável**

Título da Atividade: **Estudo químico e avaliação de atividades biológicas de Casearia spp**

**Equipe**

|  |                |
|--|----------------|
| <b>ALBERTO JOSE CAVALHEIRO</b>         | <b>UNESP</b>   |
| <b>Vanderlan da Silva Bolzani</b>      | <b>UNESP</b>   |
| <b>Andre Gonzaga dos Santos</b>        | <b>UNESP</b>   |
| <b>Aristeu Gomes Tininis</b>           | <b>IFSP</b>    |
| <b>Karin Fabiana Bandeira</b>          | <b>USP</b>     |
| <b>Paulo Michel Pinheiro Ferreira</b>  | <b>UFPI</b>    |
| <b>Paula Carolina Pires Bueno</b>      | <b>UNESP</b>   |
| <b>Carla Cristina Perez</b>            | <b>UEL</b>     |
| <b>Marcelo Rodrigues</b>               | <b>USP</b>     |
| <b>Fernando Passarelli</b>             | <b>UFSCAR</b>  |
| <b>Murilo Massao Assonuma</b>          | <b>UNESP</b>   |
| <b>Christianne Pienna Soares</b>       | <b>UNESP</b>   |
| <b>Otavio Aparecido Flausino Jr</b>    | <b>UNESP</b>   |
| <b>Gerardo Magela Vieira Jr</b>        | <b>UFPI</b>    |
| <b>Leticia Veras Costa-Lotufo</b>      | <b>USP</b>     |
| <b>Roseli Buzaneli Torres</b>          | <b>IAC</b>     |
| <b>Marcelo Mattos Cavallari</b>        | <b>EMBRAPA</b> |
| <b>Naira Buzzo Anhensine</b>           | <b>UNESP</b>   |
| <b>Cristiano Soleo de Funari</b>       | <b>UNESP</b>   |
| <b>Vinicius Guimarães Ferreira</b>     | <b>UNESP</b>   |
| <b>Everton José Ferreira de Araújo</b> | <b>UFPI</b>    |
| <b>Ricardo Gomide Woisky do Rio</b>    | <b>USP</b>     |
| <b>Jaime Antonio Aboin Sertie</b>      | <b>USP</b>     |
| <b>Claudia do O Pessoa</b>             | <b>IFC</b>     |
| <b>Dulce Helena Siqueira Silva</b>     | <b>UNESP</b>   |
| <b>Manoel Odorico Moraes Filho</b>     | <b>IFC</b>     |
| <b>Sabrina Marcela Ribeiro</b>         | <b>UNESP</b>   |
| <b>Marlise Inez Klein Furlan</b>       | <b>UNESP</b>   |
| <b>Aline Miranda Prieto</b>            | <b>UNESP</b>   |
| <b>Lilian Cherubin Correia</b>         | <b>UNESP</b>   |

### Resultados Obtidos

#### Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

|   |   |
|---|---|
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian</b>        |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY., v.198</b>                 |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Journal of Natural Products. v.79, p.1084 - 1090</b>     |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Biochemical Systematics and Ecology. v.68, p.:</b>       |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Analytical Chemistry . v.79, p.1084 - 1090, 2016.</b>    |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Journal of Ethnopharmacology. v.186, p.270 - 2</b>       |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Anais da Academia Brasileira de Ciências. v.87</b>       |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Journal of Separation Science (Print). v.38, p.16</b>    |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Chemico-Biological Interactions. v.222, p.112 -</b>      |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Food and Chemical Toxicology. v.53, p.153 - 15</b>       |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Anais da Academia Brasileira de Ciências. v.85</b>       |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Toxicology and Applied Pharmacology. v.265,</b>          |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Journal of Natural Products. v.74, p.776 - 781, 2</b>    |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Chemico-Biological Interactions. v.188, p.497 -</b>      |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Chemistry &amp; Biodiversity. v.7, p.205 - 215, 2010</b> |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Annals of Botany. v.106, p.627 - 636, 2010.</b>          |
| Identificação do meio onde foi divulgado: | <b>Journal of Natural Products. v.72, p.1847 - 1850</b>     |

Identificação do meio onde foi divulgado: **Mutagenesis. v.24, p.501 - 506, 2009.**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v.19, p.75 - 78, 2009.**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Revista Brasileira de Farmacognosia. v.19, p.75 - 78, 2009.**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Química Nova. v.30, p.1100 - 1103, 2007.**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v.8, p.11 - 14, 2007.**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Phytochemical Analysis. v.17, p.168 - 175, 2006.**

Identificação do meio onde foi divulgado: **ARKIVOC. v.2004, p.127 - 136, 2004.**

**Requerimento de propriedade intelectual**

Órgão no qual foi requerido: **INPI**

Código do requerimento: **BR 2009-645**

Número da patente: **BR 2009000645**

Órgão no qual foi requerido: **INPI**

Código do requerimento: **BR 2008-5322**

Número da patente: **BR 2008005322**

Órgão no qual foi requerido: **INPI**

Código do requerimento: **BR 2003-6167**

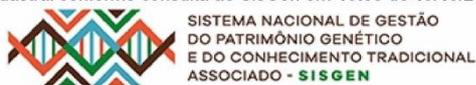
Número da patente: **BR 2003006167**

Data do Cadastro: **09/10/2018 11:31:58**

Situação do Cadastro: **Concluído**

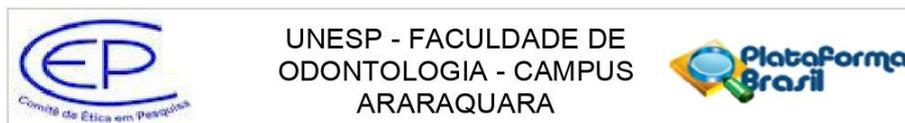


Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:38** de **19/10/2018**.



## ANEXO B - CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA

Aprovação do projeto pelo comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Formulação com extratos e frações de *Casearia sylvestris* para controle de biofilme cariogênico

**Pesquisador:** MARLISE INEZ KLEIN

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 26015019.3.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

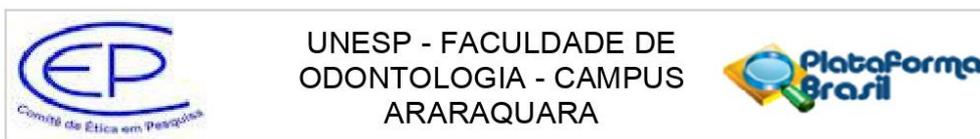
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.771.091

#### Apresentação do Projeto:

A cárie dentária é uma doença multifatorial que leva à destruição do tecido dentário. A dificuldade de erradicar esta condição demanda novas abordagens para seu controle. Portanto, o objetivo é preparar formulações com extratos brutos e frações (combinados ou não com fluoreto) de *Casearia sylvestris* (Biomata Mata Atlântica, Cerrado, Ecotone-Cerrado/Caatinga e variedades *sylvestris* e *lingua*) e testar essas formulações para o controle de biofilmes cariogênicos. Serão realizadas 4 etapas experimentais: (1) Coleta, preparo, fracionamento e análise cromatográfica (via UHPCL-DAD-HRMS e RMN) dos extratos e frações. Esses dados serão usados para o preparo de formulações (com e sem fluoreto) para as próximas etapas. (2) Análise do efeito das formulações em biofilmes de *Streptococcus mutans* formados sobre discos de hidroxiapatita com película salivar (coleta de saliva, n=6), através das análises de população microbiana, biomassa, componentes da matriz extracelular (exopolissacarídeos ou ESP solúveis e insolúveis em água, ácido lipoteicoico ou ALT e DNA extracelular ou eDNA) e da arquitetura 3D. Os dados desta etapa mostrarão qual a melhor formulação (ou formulações) para executar a etapa 3. (3) Avaliação das formulações na homeostase da microbiota (sequenciamento) e qualidade da matriz extracelular (EPS, ALT e eDNA) de biofilme microcosmo (coleta de saliva, n=30) e prevenção de desmineralização de esmalte (microdureza). Portanto, o número de voluntários para coleta de saliva para as Etapas 2 e 3 será 36 (n=36 voluntários). (4) Para as formulações mais ativas no modelo microcosmo, será avaliada a citotoxicidade em cultura de tecido bucal EpiOral TM (ensaio

**Endereço:** HUMAITA 1680  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 14.801-903  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.771.091

MTT). Para interpretação dos resultados será aplicado teste estatístico de acordo com o tipo de distribuição e nível de significância de 5%.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo principal é avaliar a efetividade de formulações de extratos e frações de *C. sylvestris* (combinados ou não com flúor) para inibir a formação e desenvolvimento de biofilme cariogênico. Assim, o estudo será dividido nos seguintes objetivos específicos: 1. Coleta, preparo, fracionamento e análise cromatográfica dos extratos e frações; 2. Análise do efeito das formulações em biofilmes formados sobre discos de hidroxiapatita com película salivar; 3. Avaliação da eficácia das formulações em modelo de biofilmes microcosmos (e desmineralização); 4. Citotoxicidade das formulações. Cada objetivo específico corresponde a uma etapa experimental do projeto.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Os riscos sociais ou físicos são mínimos para a doação de saliva. Considerando que os voluntários serão convidados a expectorar (cuspir) saliva total estimulada dentro de um contêiner plástico estéril, há o risco de que o mesmo engula o pedaço de filme de parafina. Caso isso ocorra, o filme é passível de dissolução no estômago, tal qual ocorre quando uma goma de mascar é engolida. Um outro risco possível pode ser estresse. Entretanto, a participação na pesquisa é estritamente voluntária; o voluntário pode finalizar sua participação na pesquisa a qualquer momento.

**Benefícios:** Não existem benefícios diretos aos voluntários que realizarão a doação da saliva. Entretanto, a presente pesquisa propiciará alguns avanços científicos e ajudará no desenvolvimento de novas terapias para controle de biofilme que causa cárie.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está apresentado de maneira satisfatória e justificada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

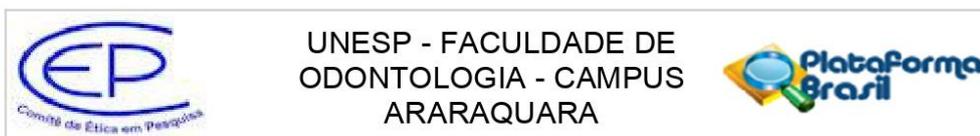
Não existem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Protocolo APROVADO em 13 de dezembro de 2019.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da

|                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| <b>Endereço:</b> HUMAITA 1680  | <b>CEP:</b> 14.801-903           |
| <b>Bairro:</b> CENTRO          |                                  |
| <b>UF:</b> SP                  | <b>Município:</b> ARARAQUARA     |
| <b>Telefone:</b> (16)3301-6459 | <b>E-mail:</b> cep@foar.unesp.br |



Continuação do Parecer: 3.771.091

pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo  | Postagem            | Autor              | Situação |
|---|--|---------------------|--------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1475548.pdf                | 11/12/2019 14:03:33 |                    | Aceito   |
| Outros  | carta_resposta_CEP_Sabrina_11_12_19.pdf                      | 11/12/2019 14:03:08 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Projeto_Sabrina_2019_etapa3_biofilme_microcosmo_mod.pdf | 11/12/2019 13:59:31 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Projeto_Sabrina_2019_etapa2_biofilme_Smutans_mod.pdf    | 11/12/2019 13:59:11 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Brochura Pesquisa   | Projeto_Doutorado_Sabrina_2019_CEP_mod.pdf                   | 11/12/2019 13:58:30 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Projeto_Sabrina_2019_etapa3_biofilme_microcosmo.pdf     | 22/11/2019 14:51:10 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Projeto_Sabrina_2019_etapa2_biofilme_Smutans.pdf        | 22/11/2019 14:50:44 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_Doutorado_Sabrina_2019_CEP.pdf                       | 22/11/2019 11:43:02 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Outros  | Termo_de_ciencia_orcamento_Sabrina2019.pdf                   | 22/11/2019 11:37:49 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | Termo_cumprimento_das_normas_do_CEP_Sabrina2019.pdf          | 22/11/2019 11:35:27 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Autorizacao_para_laboratorio_Sabrina2019.pdf                 | 22/11/2019 11:34:46 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Autorizacao_para_clinica_Sabrina2019.pdf                     | 22/11/2019 11:34:10 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Cronograma  | CRONOGRAMA_Sabrina_doutorado_2019.pdf                        | 22/11/2019 11:32:23 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |
| Folha de Rosto  | Folha_de_rosto_CEP_Sabrina2019.pdf                           | 22/11/2019 11:31:48 | MARLISE INEZ KLEIN | Aceito   |

**Endereço:** HUMAITA 1680

**Bairro:** CENTRO

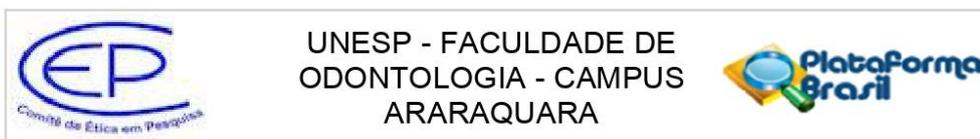
**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.771.091

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARARAQUARA, 13 de Dezembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Andréa Gonçalves**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** HUMAITA 1680

**Bairro:** CENTRO

**UF:** SP

**Telefone:** (16)3301-6459

**CEP:** 14.801-903

**Município:** ARARAQUARA

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



**Projeto de Pesquisa:**  
 Formulação com extratos e frações de *Casearia sylvestris* para controle de biofilme cariogênico

**Informações Preliminares**
**Responsável Principal**

|                               |                           |
|-------------------------------|---------------------------|
| CPF/Documento: 843.616.971-91 | Nome: MARLISE INEZ KLEIN  |
| Telefone: 16981975055         | E-mail: m7klein@yahoo.com |

**Instituição Proponente**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| CNPJ: 48.031.918/0024-10 | Nome da Instituição: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP |
|--------------------------|---|

**Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?**

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional? Não

**Equipe de Pesquisa**

| CPF/Documento  | Nome                    |
|----------------|-------------------------|
| 366.342.908-30 | Sabrina Marcela Ribeiro |

**Área de Estudo**
**Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)**

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

**Propósito Principal do Estudo (OMS)**

- Ciências Básicas

**Título Público da Pesquisa:** Formulação com extratos e frações de *Casearia sylvestris* para controle de biofilme cariogênico

**Contato Público**

| CPF/Documento  | Nome               | Telefone    | E-mail            |
|----------------|--------------------|-------------|-------------------|
| 843.616.971-91 | MARLISE INEZ KLEIN | 16981975055 | m7klein@yahoo.com |

**Contato Científico:** MARLISE INEZ KLEIN

**Autorizo a publicação deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 03 de fevereiro de 2023.**

**Sabrina Marcela Ribeiro**