

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/07/2021.



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



Sabrina Marcela Ribeiro

Atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos e frações de *Casearia sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Araraquara

2019



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



Sabrina Marcela Ribeiro

Atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos e frações de *Casearia sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

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

Orientadora: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein
Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2019

Ribeiro, Sabrina Marcela

Atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos e frações de *Casaria sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* / Sabrina Marcela Ribeiro. – Araraquara: [s.n.], 2019
86 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) -
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Marliise Inêz Klein
Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

1. *Streptococcus mutans* 2. *Candida albicans* 3. *Casaria*
4. Placa dentária I. Título

Sabrina Marcela Ribeiro

Atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos e frações de *Casearia sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein

2º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3º Examinador: Prof. Dr. Bruno Bueno-Silva

Araraquara, 05 de Julho de 2019.

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

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou até aqui;

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;

Às minhas tias Andreza, Adriana, Eliana e Fabiana, pelo carinho e admiração;

Aos meus primos Eduardo, Felipe, Pedro, Isabelle, Maria Laura, Gustavo e Vinicius pelo companheirismo e cumplicidade;

Ao meu namorado 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 Janaína Habib Jorge e Josimeri Hebling Costa, por gentilmente participarem da minha banca de pré-qualificação e de qualificação do mestrado;

Aos professores Bruno Bueno-Silva e Ewerton Garcia de Oliveira Mima, por gentilmente aceitarem o convite para banca de defesa da dissertação do mestrado;

Aos Laboratório de Microbiologia Aplicada e Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela disponibilidade de utilização do espaço e equipamentos;

À Dr. Paula Aboud Barbugli Bruna Pimental pela ajuda para o cultivo dos queratinócitos para os testes de citotoxicidade celular;

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Bolsa de mestrado – Processo nº 2017/07408-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa;

Às técnicas Luana de Sales Leite e Jaqueline da Silva Colin, pela colaboração;

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, em nome da diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos, responsáveis pela gestão e apoio a todos os alunos;

À pós-graduação em Reabilitação Oral, em nome da coordenadora Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, por possibilitar o início da minha carreira científica;

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, Midian Clara Castillo Pedraza e todos os alunos de Iniciação científica) pela troca de conhecimento.

“Pense nos seus sonhos e nas suas ideias como pequenas máquinas milagrosas dentro de você que ninguém mais pode tocar. Quanto mais fé você deposita nelas, mais altas elas ficam, até que um dia elas se erguerão e levarão você junto”.

O Menino que Descobriu o Vento*

* Bryan Mealer, William Kamkwamba. O Menino que Descobriu o Vento. Rio de Janeiro: Obejetiva; 2011.

Ribeiro SM. Atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos e frações de *Casearia sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

A cárie dentária é um problema de saúde pública mundial causada por uma interação entre dieta rica em açúcar e microrganismos em biofilmes dentais. Abordagens para controlar esses microrganismos em biofilmes são necessárias. Portanto, o objetivo foi avaliar potencial antimicrobiano (cultura planctônica) e antibiofilme de doze extratos de *Casearia Sylvestris* (0,50 mg/mL) de diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal) e variedades (*sylvestris*, *lingua* e intermediária) contra duas espécies encontradas em biofilmes cariogênicos (*Streptococcus mutans* e *Candida albicans*). A caracterização química dos extratos brutos foi feita via cromatografia. A atividade antimicrobiana foi determinada pela população microbiana (UFC/mL) enquanto a atividade antibiofilme pela população microbiana (UFC/mL) e biomassa dos biofilmes tratados. Para os extratos ativos para *S. mutans*, foi avaliado o efeito na formação inicial da matriz de glucanos (atividade de GtfB), o desprendimento após a adesão desta bactéria à película salivar e à matriz inicial de glucanos e citotoxicidade via ensaio MTT. Também foi avaliado o potencial antimicrobiano contra *S. mutans* de três frações (metanol, acetato de etila e hexano; 0,25 mg/mL) oriundas dos doze extratos. Três extratos do bioma Mata Atlântica e variedade *sylvestris* reduziram em $\geq 50\%$ (ou ≥ 3 logs) as contagens de células viáveis de *S. mutans* (vs. veículo; $p < 0,0001$), enquanto dois extratos, pertencentes ao mesmo bioma e variedade, também diminuíram em $\cong 50\%$ as contagens de células viáveis de *C. albicans* (vs. veículo; $p < 0,0001$). Para os biofilmes de *S. mutans*, três extratos reduziram em $\geq 90\%$ a biomassa (vs. veículo; $p > 0,0001$), destes, dois reduziram em 100% da população microbiana e um em $\cong 50\%$ (vs. veículo; $p < 0,0001$). No entanto, para o biofilme fúngico, dois extratos promoveram uma redução de $> 50\%$ das contagens de células viáveis (vs. veículo; $p < 0,0001$) e nenhum reduziu a biomassa. Os extratos com potencial atividade antimicrobiana e antibiofilme apresentaram maior teor de diterpenos do tipo clerodano e menor teor de flavonoides glicosilados em relação aos extratos menos ativos. Entre os quatro extratos promissores, três

reduziram a quantidade de glucanos formados por GtfB (vs. veículo; $p \leq 0,0136$) e nenhum promoveu redução significativa da remoção de células aderidas à película (vs. veículo; $p > 0,05$). Entretanto, um maior número de células de *S. mutans* foi removido após adesão à matriz de glucanos quando tratados por esses extratos (vs. veículo; $p \leq 0,0031$). Os extratos foram citotóxicos contra células de linhagem NOK-si após exposição de 1 h (vs. controle de viabilidade); porém, não houve diferença quando os extratos foram comparados com o controle veículo ($p > 0,999$). Das três frações avaliadas para cada extrato, apenas as frações acetato de etila reduziram a população microbiana de *S. mutans* (vs. veículo; $p < 0,0001$), exceto uma ($p > 0,05$). Destas, três causaram a redução da população microbiana em $\geq 80\%$, as três frações pertencem à var. *lingua*, duas contemplam o bioma Cerrado e uma, o bioma Ecotone (Cerrado/Caatinga). Portanto, extratos de *C. sylvestris* da Mata Atlântica e var. *sylvestris* e frações acetato de etila do bioma Cerrado e Ecotone, var. *lingua* poderiam ser utilizados como uma estratégia terapêutica contra microrganismos envolvidos na patogênese da cárie.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. *Casearia*. Placa dentária.

Ribeiro SM. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts and fractions from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

Dental caries is a worldwide public health problem caused by an interaction between a diet rich in sugar and microorganisms in dental biofilms. Approaches to control these microorganisms in biofilms are necessary. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial (planktonic) and antibiofilm potential of twelve *Casearia sylvestris* extracts (0.50 mg/mL) from different Brazilian biomes (Atlantic Forest, Cerrado, Caatinga, Pampa and Pantanal) and variety (*sylvestris*, *lingua* and intermediate) against two species found in cariogenic biofilms (*Streptococcus mutans* and *Candida albicans*). The chemical characterization of crude extracts was done via chromatography. The antimicrobial activity was determined by the viable microbial population (CFU/mL) and the antibiofilm activity by the viable microbial population (CFU/mL) and biomass of the biofilms treated. For the extracts active for *S. mutans*, the effect on the initial formation of the glucan matrix (GtfB activity), the release after adhesion of this bacterium to the salivary film and the initial matrix of glucans and cytotoxicity via the MTT assay was evaluated. In addition, the antimicrobial potential against *S. mutans* of three fractions (methanol, ethyl acetate and hexane, 0.25 mg/mL) from the twelve extracts was also evaluated. Three extracts of the Atlantic Forest biome and *sylvestris* variety reduced the counts of viable *S. mutans* cells (vs. vehicle, $p < 0.0001$) by $\geq 50\%$ (or ≥ 3 logs), while two extracts belonging to the same biome variety, also decreased $\cong 50\%$ the viable cell counts of *C. albicans* (vs. vehicle, $p < 0.0001$). For *S. mutans* biofilms, three extracts reduced biomass by $\geq 90\%$ (vs. vehicle; $p > 0.0001$), of which two reduced in 100% of the microbial population and one in $\cong 50\%$ (vs. vehicle; $p < 0.0001$). However, for the fungal biofilm, two extracts promoted a $> 50\%$ reduction in viable (vs. vehicle; $p < 0.0001$) and none reduced biomass. The extracts with higher antimicrobial activity and antibiofilm presented higher content of clerodanic diterpenes and lower content of glycosylated flavonoids in relation to the less active extracts. Among the four promising extracts, three reduced the amount of glucans formed by GtfB (vs. vehicle, $p < 0.0136$) and none significantly reduced the removal of adhered cells to the film (vs. vehicle; $p > 0.05$). However, a larger number of *S. mutans*

cells were removed after adhesion to the glucan matrix when treated by these extracts (vs. vehicle, $p < 0.0031$). The extracts were cytotoxic against NOK-si lineage cells after 1 h exposure (vs. viability control); however, there was no difference when the extracts were compared with the vehicle control ($p > 0.999$). Of the three fractions evaluated for each extract, only the ethyl acetate fractions reduced the microbial population of *S. mutans* (vs. vehicle; $p < 0.0001$), except one ($p > 0.05$). Of these, three caused the reduction of the microbial population in $\geq 80\%$, the three fractions belong to var.*lingua*, two include the Cerrado biome and one, the Ecotone biome (Cerrado/Caatinga). Therefore, extracts of *C. sylvestris* from the Atlantic Forest and var. *sylvestris* and ethyl acetate fractions of the Cerrado and Ecotone biome; var. *lingua* can be used as a therapeutic strategy against microorganisms involved in the pathogenesis of dental caries.

Key words: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. *Casearia*. Dental biofilm.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Cárie Dentária	19
3.2 Biofilme Dental	20
3.3 Matriz Extracelular do Biofilme	22
3.3.1 Exopolissacarídeos	23
3.3.2 DNA extracelular e ácidos lipoteicóicos	24
3.4 <i>Streptococcus mutans</i>	24
3.5 <i>Candida albicans</i>	25
3.6 Controle do Biofilme Cariogêncio	26
3.6.1 Produtos naturais para terapias antibiofilme	28
3.7 <i>Casearia sylvestris</i>	29
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Extratos Brutos e Frações de <i>C. sylvestris</i> de Biomassas Distintos do Brasil	34
4.1.1 Fracionamento dos extratos brutos	34
4.1.2 Caracterização química dos extratos brutos	35
4.2 Cepas e Crescimento Microbianos	37
4.3 Ensaios de Atividade Antimicrobiana	37
4.4 Ensaios de Atividade Antibiofilme	39
4.4.1 Biomassa de biofilmes após os tratamentos	39
4.4.2 População microbiana dos biofilmes após os tratamentos	40
4.5 Efeito de Extratos Seleccionados na Formação Inicial da Matriz de Glucanos (atividade de GtfB) e no Desprendimento de <i>S. mutans</i> após a Adesão à Película Salivar e à Matriz Inicial de Glucanos	40
4.5.1 Purificação do GtfB	40

4.5.2 Formação de película salivar sobre superfície de hidroxiapatita	40
4.5.3 Formação inicial da matriz de glucanos e tratamentos para avaliar a inibição da síntese de glucanos via GtfB.....	41
4.5.4 Desprendimento de <i>S. mutans</i> após a adesão à película salivar e glucanos tratados com extratos selecionados	42
4.5.4.1 Adesão de <i>S. mutans</i> à película salivar (sHA)	42
4.5.4.2 Adesão de <i>S. mutans</i> à matriz inicial de glucanos (gsHA)	43
4.6 Citotoxicidade dos Extratos Selecionados	43
4.6.1 Cultura celular	43
4.6.2 Ensaio de viabilidade celular – MTT	44
4.7 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Caracterização Química de Extratos Brutos de <i>C. sylvestris</i> de Distintos Biomas Brasileiros	46
5.2 Atividade Antimicrobiana	47
5.3 Atividade Antibiofilme	50
5.4 Efeito de Extratos Selecionados na Atividade de GtfB	51
5.5 Desprendimento de <i>S. mutans</i> Após Adesão à Película Salivar e à Matriz Inicial de Glucanos Tratada com Extratos Selecionados	52
5.6 Citotoxicidade de Extratos Selecionados	54
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	76
APÊNDICE B	77
APÊNDICE C	78
APÊNDICE D	79
ANEXO A	80
ANEXO B	84

1 INTRODUÇÃO

Biofilmes frequentemente contribuem e/ou causam doenças em humanos, incluindo aquelas que ocorrem na boca, como a cárie dentária ^{1, 2}. A cárie dentária ainda é a condição bucal associada ao biofilme (ou placa dental) mais prevalente no mundo ^{3, 4, 5}, que tem impacto negativo na qualidade de vida de milhões de pessoas ^{3, 4, 5}. Esta doença ubíqua resulta de interações complexas entre organismos orais específicos, fatores do hospedeiro e dieta, que promovem a transição de um biofilme saudável para um patogênico na superfície dos dentes ^{6, 7}. Assim, o controle da formação desse biofilme pode ser uma estratégia para prevenção da cárie.

Streptococcus mutans desempenha um papel fundamental na modulação e transição da forma não patogênica para biofilmes altamente cariogênicos ⁸, embora organismos adicionais possam estar associados ⁹⁻¹¹. Esta espécie é altamente acidogênica e acidúrica e é a principal produtora de matriz extracelular em biofilmes dentários ⁷. Além disso, *S. mutans* codifica múltiplas exoenzimas (por exemplo, glicosiltransferases ou Gtfs) que a torna uma das principais produtoras de exopolissacarídeos (EPS) ^{7, 12}. As Gtfs são secretadas para o meio extracelular, tornam-se constituintes da película salivar e são também adsorvidas às superfícies de *S. mutans* e de outros microrganismos, como *Candida albicans*, mantendo a atividade enzimática ^{7, 13, 14}. A síntese de glucanos na película proporciona sítios de ligação microbianos adicionais, enquanto os polímeros na superfície de microrganismos aumentam a coesão entre os mesmos ^{7, 13, 14}.

C. albicans é de longe o fungo mais comumente detectado em superfícies de mucosa humana e, frequentemente participa na formação de biofilmes polimicrobianos em superfícies bióticas e abióticas ^{15, 16} quando há adequada disponibilidade de sacarose ¹⁷. Este fungo tem uma extraordinária capacidade acidogênica e tolerância ao ácido e, sua associação com *S. mutans* resulta no aumento da formação de EPS, potencializando a cariogenicidade dos biofilmes ^{18, 19}. Ainda, *C. albicans* produz e secreta exoenzimas capazes de degradar o colágeno dentinário sob condições ácidas, contribuindo para virulência do biofilme ^{20, 21}.

Prevenir a formação deste biofilme é fundamental para evitar a ocorrência de cárie. A clorexidina (agente antimicrobiano de amplo espectro) e o flúor são considerados padrão ouro na odontologia para tratamento de biofilme e prevenção da

cárie, respectivamente. Porém, a clorexidina suprime a microbiota bucal ²² e não é adequada para o uso preventivo e/ou terapêutico diário e contínuo devido aos seus efeitos colaterais, como alteração do paladar, pigmentação de dentes, entre outros ²². Enquanto o flúor oferece proteção incompleta contra a doença e trata inadequadamente o aspecto infeccioso da cárie ²³, pois sua principal contribuição é promover a remineralização.

As circunstâncias supracitadas tornam necessária a busca de estratégias para o controle e/ou modulação de biofilmes cariogênicos, com maior potencial antimicrobiano e, ao mesmo tempo, não causem toxicidade ao organismo humano. Uma abordagem atraente seria o uso e/ou a inclusão de agentes bioativos que afetem a virulência de microrganismos patogênicos, sem desequilibrar a microbiota normal da boca. Assim, houve um crescente interesse dos pesquisadores e da indústria no desenvolvimento de novas terapias baseadas em produtos naturais ²⁴, o uso destes produtos para redução da patogenicidade da placa dental poderia tornar a prevenção da cárie menos dependente do flúor e de antimicrobianos convencionais.

Os produtos naturais possuem uma ampla gama de atividades e funções, e têm um histórico rico de uso na medicina tradicional. O presente estudo utilizou extratos brutos e frações de *Casearia sylvestris* de biomas do Brasil, pertencentes às variedades (var.) *lingua*, *sylvestris* e intermediária. Esta planta, popularmente conhecida como guaçatonga, distribui-se pelas regiões tropicais e subtropicais do Brasil, bem como em outros países da América do Sul e Asiáticos. Possui um enorme arsenal farmacológico e citotóxico, propriedades anti-inflamatórias, antiplasmodiais e antiulcerogênica, observadas em estudos in vitro e pré-clínicos ²⁵. Porém, pouco está elucidado sobre sua atividade antimicrobiana ^{26, 27}, enquanto é inexistente seu efeito antibiofilme cariogênico. O perfil químico de extratos de folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (Mata-Atlântica) é rico em diterpenos, considerados marcadores taxonômicos para este gênero ²⁸; enquanto compostos fenólicos (flavonoides) predominam na var. *lingua* (Cerrado) ^{29, 30}.

Esta variada composição fitoquímica dos extratos das folhas de *C. sylvestris* ^{29, 30} fornece uma rica fonte de moléculas que podem apresentar propriedades para controle de biofilme cariogênico. A prospecção de compostos retirados de extratos vegetais com propriedades antimicrobianas e antibiofilme é uma estratégia relevante para odontologia e outras áreas.

7 CONCLUSÃO

Os extratos e frações de *C. sylvestris* específicos utilizados neste estudo são eficazes na inibição de microrganismos patogênicos relacionados à cárie dentária e são, portanto, candidatos promissores para o desenvolvimento de formulação para prevenção de cárie, que precisa ser testada em estudos futuros. Portanto, as conclusões específicas deste estudo são:

- Os extratos FLO/SC, GUA/CE e PRE/SP reduziram a população microbiana de *S. mutans* em sua forma livre (planctônica). GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP apresentaram redução concomitante da população microbiana e biomassa dos biofilmes de *S. mutans*;
- Todas as frações acetato de etila reduziram a população de *S. mutans* em sua forma livre, exceto a fração PAC/CE. Entre estas, as frações ARA/SP, CAR/CE e SRM/MG apresentaram os maiores valores de redução;
- PAC/CE e PRE/SP reduziram a população microbiana de *C. albicans* tanto em sua forma livre como quando em biofilmes; entretanto, nenhum extrato reduziu a biomassa de biofilmes desse fungo;
- FLO/SC, GUA/CE e PRE/SP reduziram a quantidade de glucanos formados por GtfB;
- Um maior número de células de *S. mutans* foi removido após adesão à matriz de glucanos quando tratados FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP e nenhum destes promoveu redução das células aderidas à película tratada;
- A citotoxicidade dos extratos e do controle veículo foi similar e todos foram citotóxicos aos queratinócitos.

REFERÊNCIAS*

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22.
2. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009; 11(7): 1034-43.
3. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJ. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013; 92(7): 592-7.
4. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res*. 2015; 94(5): 650-8.
5. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. GBD 2015 Oral Health Collaborators. 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): 380-7.
6. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149(2): 279-94.
7. 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.
8. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50(4): 353-80.
9. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005; 33(4): 248-55.
10. 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.
11. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol*. 2018; 26(3): 229-42.
12. 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.

* 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>

13. 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.
14. Vacca-Smith AM, Bowen WH. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. *Arch Oral Biol.* 1998; 43(2): 103-10.
15. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299: 1-8.
16. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011; 19(11): 557-63.
17. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 789-98.
18. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes the virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82: 1968-81.
19. Kim D, Sengupta A, Niepa THR, Lee B-H, Weljie A, Freitas-Blanco VS, et al. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via crosskingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep.* 2017; 7: 41332.
20. Klink HT, Pönisch R, Kriegel TM, Klimm HW. Immunohistochemical detection of the collagenolytic *Candida albicans* sap 2 proteinase in caries lesions. *Caries Res.* 2007; 41: 287.
21. Klink HT, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009; 43: 83-91.
22. 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.
23. ten Cate JM. Novel anticaries and remineralizing agents: prospects for the future. *J Dent Res.* 2012; 91(9): 813-5.
24. 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.
25. Ferreira PMP, Lotufo CVL, Moraes MO, Barro FWA, Martins AMA, Cavaleiro AJ, et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais Acad Bras Cienc.* 2011; 83(4): 1373-84.

26. 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 Cienc Farm Basica Apl.* 2008; 29(3): 25760.
27. Cavaleiro 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.
28. Xia L, Guo Q, Tu P, Chai X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev.* 2015; 14: 99-135.
29. Claudino JC, Sacramento LV, Koch I, Santos HA, Cavaleiro AJ, Tininis AG, Santos AG. 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.
30. Bueno PCP, Pereira FMV, Torres RB, Cavaleiro A J. 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.
31. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; 369 (9555): 51-9.
32. Keyes, PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol.* 1960; 1(4): 304-20.
33. Newbrun E. Histopathology of dental caries. In: Newbrun E. *Cariology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1979.
34. Fejerskov O, Manji F. Reactor paper: risk assessment in dental caries. In: Bader JD, editor. *Risk assessment in dentistry*. North Carolina, Chapel Hill: University of Dental Ecology; 1990. p. 215-7.
35. Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health--World Health Assembly 2007. *Int Dent J.* 2008; 58(3): 115-21.
36. Listl, S, Galloway, J, Mossey, PA, Marcenes, W. Global economic impact of dental diseases. *J Dent Res.* 2015; 94(10): 1355-61.
37. 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.
38. 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.
39. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1): 137-43.

40. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2): 83-101.
41. Foster JS, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Human oral cavity as a model for the study of genome-genome interactions. *Biol Bull*. 2003; 204: 200-4.
42. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978; 238(1): 86-95.
43. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2):167-93.
44. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005; 13(1): 20-6.
45. Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci*. 2011; 3(2): 49-54.
46. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS / MS. *J Proteome Res*. 2007; 6(6): 2152-60.
47. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent*. 2011; 2001: 953412.
48. Guo L, Hu W, He X, Lux R, McLean J, Shi W. Investigating acid production by *Streptococcus mutans* with a surface-displayed pH-sensitive green fluorescent protein. *PLoS One* 2013; 8(2): e57182.0.
49. van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev*. 1990; 54(1): 75-87.
50. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 1995; 15(3): 169-75.
51. Dang H, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(2): 467-75.
52. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; 73(3): 407-50.
53. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (11):4121-8.
54. Palmer CA, Kent R Jr, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. *J Dent Res*. 2010; 89(11): 1224-9.

55. Rickard H, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003; 11(2): 94-100.
56. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(9): 623-33.
57. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans* derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5(10): 1-10.
58. Xiao J, Klein MI, Delahunty CM, Yates III JR, Lu B, Heydorn A, Falsetta ML, 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.
59. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73(2): 310-47.
60. Perry JA, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299 (2): 261-6.
61. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92(12): 1065-73.
62. Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR, et al. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2017; 33(9): 722-40.
63. 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): 24-34.
64. Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res.* 1998; 77(3): 445-52.
65. 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.
66. Venkitaraman AR, Vacca-Smith AM, Kopec LK, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferase B, GtfC, and GtfD in solution and on the surface of hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74: 1695-701.

67. 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.
68. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13478.
69. Melvaer KL, Helgeland K, Rølla G. Some physical and chemical properties of 'soluble' and 'insoluble' polysaccharides produced by strains of *Streptococcus mutans* and *sanguis*. *Caries Res.* 1972; 6(1): 79.
70. Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol.* 2000; 42: 239-74.
71. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008; 154: 3247-55.
72. Ciardi JE, Rølla G, Bowen WH, Reilly JA. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Scand J Dent Res.* 1977; 85(6): 387-91.
73. Rølla G, Ciardi JE, Bowen WH. Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res.* 1983; 91(3): 186-90.
74. Hogg SD, Whiley RA, De Soet JJ. Occurrence of lipoteichoic acid in oral streptococci. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47(1): 62-6.
75. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(9): 5404-10.
76. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006; 59(4): 1114-28.
77. 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.
78. Melvaer KL, Helgeland K, Rølla G. A charged component in purified polysaccharide preparations from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol.* 1974; 19(7): 589-95.
79. Melsen B, Kaae O, Rølla G, Fejerskov O, Karring T. Penetration of ions in human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1979; 24(1): 75-81.
80. Kuramitsu HK, Wondrack L, McGuinness M. Interaction of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases with teichoic acids. *Infect Immun.* 1980; 29 (2): 376-82.

81. Ciardi JE, Reilly JA, Haller RH, Bowen WH, Rolla G. The role of lipoteichoic acid in the adherence and colonization of oral streptococci. In: Shockman GD, Wicken AJ, editor. Chemistry and biological activities of bacterial surface amphiphiles. New York: Academic Press.; 1981.p. 353-64.
82. Chiu TH, Baker JJ. Lipoteichoic acid from *Streptococcus sanguis* is a natural glucosyl acceptor for glucosyltransferases. Biochem Biophys Res Commun. 1994; 202(3): 1407-12.
83. 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): 3405-8.
84. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res. 2011; 90(3): 294-303.
85. Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? J Am Dent Assoc. 2002; 13(2): 126-31.
86. Gronroos L, Saarela M, Matto J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusa S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. Infect Immun. 1998; 66(6): 2595- 600.
87. Palmer SR, Miller JH, Abranches J, Zeng L, Lefebure T, Richards VP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomically-diverse isolates of *Streptococcus mutans*. PLoS One. 2013; 8(4): e61358.
88. Vacca Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, et al. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. Caries Res. 2007; 41(6): 445-50.
89. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. J Dent Res. 1995; 74(7): 1360-6.
90. McCabe RM, Donkersloot JÁ. Adherence of *Veillonella* species mediated by extracellular glucosyltransferase from *Streptococcus salivarius*. Infect Immun. 1977; 18: 726-34.
91. 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.
92. Budtz-Jørgensen E, Theilade E, Theilade J. Quantitative relationship between yeast and bacteria in denture-induced stomatitis. Scand J Dent Res. 1983; 91(2): 134-42.
93. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(6): 588-94.

94. Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. PLoS Pathog. 2012; 8(4): e1002585.
95. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett. 2002; 214(1): 95-100.
96. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog. 2010; 6(4): e1000886.
97. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(5): 340-9.
98. Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. Infect Immun. 1990; 58(5): 1429-36.
99. Jenkinson HF, Douglas LJ. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. Polymicrobial diseases. Washington (DC): ASM Press; 2002. Chapter 18. [acesso 2018 set 24]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2486/>
100. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol Mol Biol Rev. 2011; 75(4): 583-609.
101. Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. Cell Microbiol. 2014; 16(2): 214-31.
102. Hwang G, Marsh G, Gao L, Waugh R, Koo H. Binding force dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *Candida albicans*. J Dent Res. 2015; 94(9): 1310-7.
103. 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.
104. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, Leite LS, 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.
105. Morris A, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. Br Dent J. 2001; 19(4): 186-92.
106. van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of selfperformed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. J Clin Periodontol. 2005; 32 Suppl 6: 214-28.

107. Sahin K, Khashai F, Forghany A, Krasieva T, Wilder-Smith P. Exploring mechanisms of biofilm removal. *Dentistry (Sunnyvale)*. 2016; 6(4): 371.
108. Hardwick K, Barmes D, Richardson LM. International collaborative research on fluoride. *J Dent Res*. 2000; 79: 893-904.
109. Dawes C, ten Cate JM. International symposium on fluorides: mechanisms of action and recommendation for use. *J Dent Res*. 1990; 69 (spec issue): 505-836.
110. Featherstone JD. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health*. 2006; 6 Suppl 1: 8.
111. Featherstone JD. Remineralization, the natural caries repair process—the need for new approaches. *Adv Dent Res*. 2009; 21(1): 4-7.
112. Jones CG. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997; 15: 55-62.
113. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(5): 1461-8.
114. Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J, Kuzmiak-Jones H, Cole MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. *J Am Dent Assoc*. 1980; 100(5): 677-81.
115. Firestone AR, Shmid R, Muhlemann HR. Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency-controlled feedings in rats. *Arch Oral Biol*. 1982; 27(9): 759-63.
116. Fu DT, Robyt JF. Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr Res*. 1991; 217: 201-11.
117. Mira A. Oral microbiome studies: potential diagnostic and therapeutic Implications. *Adv Dent Res*. 2018; 29(1): 71-7.
118. Liu Y, Ren Z, Hwang G, Koo H. Therapeutic strategies targeting cariogenic biofilm microenvironment. *Adv Dent Res*. 2018; 29(1): 86-92.
119. ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res*. 2009; 21: 8-12.
120. Phillipson JD. 50 years of medicinal plant research - every progress in methodology is a progress in science. *Planta Med*. 2003; 69: 491-5.
121. Basile AC, Sertiè JAA, Pannizza S, Oshiro TT, Azzolini CA. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J Ethnopharmacol*. 1990; 30(2): 185-97.

122. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(3): 206-20.
123. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta.* 2013: 3670-95.
124. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016; 79(3): 629-61.
125. Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. *Adv Dent Res.* 2009; 21(1): 63-8.
126. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr.* 2007; 137:830S–7S.
127. Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, et al. Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res.* 2012; 92(7): 604-8.
128. Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T, Mateo LR, Ellwood R, Cummins D, et al. Two-year caries clinical study of the efficacy of novel dentifrices containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride. *Caries Res.* 2013; 47(6): 582-90.
129. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(1):17-27.
130. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243-63.
131. Instituto de Botanica Darwinion. Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina: Flacourtiaceae. 2002. [acesso 2018 setembro 18]. Disponível em: <http://www.darwin.edu.ar>
132. Little EL, Wadsworth FL. Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands. Washington: Department of Agriculture; 1964. p. 548.
133. Hack C, Longhi SJ, Boligon AA, Murari AB, Pauleski DT. Análise fitossociológica de um fragmento de floresta estacional decidual no município de Jaguari, RS. *Cienc Rural.* 2005; 35: 1083-91.
134. Torres RB, Yamamoto K. Taxonomia das espécies de *Casearia Jacq.* (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. *Rev Bras Bot.* 1986; 9: 239-58.
135. Absy ML, Scavone O. Sobre a morfologia e anatomia de *Casearia sylvestris* Swarts. *Bol Zool Biol.* 1973; 30: 641-76.
136. Hoehne FC. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphicars; 1939. p. 355.

137. Itokawa H, Totsuka N, Morita H, Takeya K, Iitaka Y, Schenkel EP, et al. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. Chem Pharm Bull. 1990; 38(12): 3384-8.
138. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2000; 127(1):21-30.
139. Silva FB, Almeida JM, Sousa SM. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. Pesq Odontol Bras. 2004; 18(2): 174-9.
140. Gomes CLN, Maciel MCG, Guerra RNM, Abreu-Silva AL, Nascimento FRF. Avaliação do efeito cicatrizante da *Casearia sylvestris* (guaçatonga) em camundongos. J Bras Fitom. 2005; 3(2): 48-55.
141. Esteves I, Souza IR, Rodrigues M, Cardoso LG, Santos LS, Sertie JA, et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. J Ethnopharmacol. 2005; 101(1-3): 191-6.
142. Carvalho PRF, Furlan M, Young MCM, Kingston DGI, Bolzani VS. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. Phytochem. 1998; 49(6): 1659-62.
143. 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.
144. Da Silva SL, Chaar JS, Damico DCS, Figueiredo PMS, Yano T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. Pharm Biol. 2008; 46: 347-51.
145. Chiappeta ADA, De Mello J, Maciel GM. Higher plants with biological activity - plants of Pernambuco. Rev Inst Antibiot. 1983; 21: 43-50.
146. Mosaddik MA, Banbury L, Forster P, Booth R, Markham J, Leach D, et al. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. Phytomedicine. 2004; 11: 461-6.
147. Silva FA, Baisch ALM, Oliveira B, Battastini AM, Torres F, Racoski G, Silva ES, Alam MF, Apolinário JCG, Lapa AJ. Estudos Farmacológicos Preliminares dos Extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. Acta Amazônica. 1988; 18 Suppl.1-2: 219-29.
148. Bueno PCP, Passareli F, Anhesine NB, Torres RB, Cavaleiro AJ. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety *lingua* (Salicaceae). Biochem Syst Ecol. 2016; 68: 23-6.

149. Sousa FG, Schneider NFZ, Mendes CE, Moura NF, Denardin RBN, Matuo R, et al. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* Swart. J Essent Oil Res. 2007; 19: 376-8.
150. Wang W, Ali Z, Li XC, Khan IA. Clerodane and ent-kaurane diterpene glycosyl and glycoside derivatives from the leaves of *Casearia sylvestris*. Helv Chim Acta. 2009; 92: 1829-39.
151. Raslan DS, Jamal CM, Duarte DS, Borges MH, De Lima ME. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. Bollettino Chimico Farmaceutico. 2002; 141: 457-60.
152. Wang W, Ali Z, Li XC, KHAN IA. Neolignans from the leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. Helv Chim Acta. 2010; 93: 139-46.
153. Rozza AL, Pellizzon CH. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. Fundam Clin Pharmacol. 2013; 27:63.
154. Junges MJ, Schenkel EP, Simões CMO. Flavonoides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva-de-bugre). Cad Farm. 1985; 1: 95-101.
155. 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 (Tokyo). 1991; 39(3): 693-7.
156. Santos AG, Ferreira PMP, Vieira-Junior 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.
157. ANAPYON Líquido Barueri: DM (HYPM) [acesso em 2018 set 18]. Disponível em: <https://www.Bulas.Med.br/p/bulasdemedicamentos/bula/1939/anapyon+liquido.htm>.
158. Laboratório Panizza Fitoterápico. [acesso em 2018 set 18]. Disponível em: <http://www.conbrafito.org/Produtos/PopupCosmeticos.asp?IID=12038>.
159. Eloff JN. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. Phytomedicine. 2004; 11: 370-1.
160. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. J Ethnopharmacol. 2005; 100: 80-4.
161. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med. 1998; 64: 711-4.

162. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG Jr, Bowen WH. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*. 1996; 41(3): 291-8.
163. 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.
164. 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.
165. Castilho RM, Squarize CH, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkind JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS One*. 2010; 5(5): e10503.
166. Van Dijck P, Sjollem 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.
167. Philip N, Bandara HMHN, Leishman SJ, Walsh LJ. Inhibitory effects of fruit berry extracts on *Streptococcus mutans* biofilms. *Eur J Oral Sci*. 2019; 127(2): 122-9
168. Maltz M, Beighton D. Multidisciplinary research agenda for novel antimicrobial agents for caries prevention and treatment. *Adv Dent Res*. 2012; 24: 133-6.
169. Jeon JG, Klein MI, Xiao J, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 228.
170. Quivey RG Jr, Grayhack EJ, Faustoferri RC, Hubbard CJ, Baldeck JD, Wolf AS, et al. Functional profiling in *Streptococcus mutans*: construction and examination of a genomic collection of gene deletion mutants. *Mol Oral Microbiol*. 2015; 30(6):474-95.
171. 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). pii: e01674-17.
172. Exterkate RA, Crielaard W, ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res* 2010; 44: 372-9.
173. ten Cate JM. Models and role models. *Caries Res*. 2015; 49: 3-10.

174. 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.
175. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. J Dent Res. 2005; 84(11): 1016-20.
176. Koo H: Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. Adv Dent Res. 2008; 20(1): 17-21.
177. Yamamoto MM. *C. sylvestris* Sw.: aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos [Monografia-Curso de Especialização em Ciências Farmacêuticas-Produtos Naturais]. Curitiba: Universidade Federal de Paraná; 1995.
178. Luz SFB, Sato MEO, Duarte MR, Santos CAM. Parâmetros para controle de qualidade de folhas de *C. sylvestris* SW. -Guaçatonga. Rev Bras Farmacogn. 1998; 7: 1-11.
179. Santos AG, Perez CC, Tininis AG, Bolzani VS, Cavaleiro AJ. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. Quim Nova. 2007; 30: 1100-3.
180. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 1996; 50(1): 27-34.
181. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agentes. Clin Microbial Rev. 1999; 12(4): 564-82.
182. 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.
183. Hasan S, Singh K, Danisuddin M, Verma PK, Khan AU. Inhibition of major virulence pathways of *Streptococcus mutans* by quercitrin and deoxynojirimycin: a synergistic approach of infection control. PLoS One. 2014; 9(3): e91736.
184. Zeng Y, Nikitkova A, Abdelsalam H, Li J, Xiao J. Activity of quercetin and kaemferol against *Streptococcus mutans* biofilm. Arch Oral Biol. 2019; 98: 9-16.
185. 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: 50-6.

186. 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.
187. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev. 1995; 59(2): 201-22.
188. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol. 2001; 91(3): 453-62.
189. Grande-Tovar CD, Chaves-Lopez C, Viuda-Martos M, Serio A, Delgado-Ospina J, Perez-Alvarez Ja, et al. Sub-lethal concentrations of Colombian *Austro eupatorium inulifolium* (H.B.K.) essential oil and its effect on fungal growth and the production of enzymes. Ind Crops Prod. 2016; 87: 315-23.
190. Kumar KN, Venkataramana M, Allen JA, Chandranayaka S, Murali HS, Batra HV. Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*. Food Sci Technol. 2016; 69: 522-8.
191. Vasconcelos LC, Sampaio MC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. Mycoses. 2003; 46(5-6): 192-6.
192. Abreu AC, Malheiro ABJ, Simões M. Resurgence of the interest in plants as sources of medicines and resistance-modifying agents. In: Méndez-Vilas A, ed. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2013.
193. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. Cell Press. 1997; 90(5): 939-49.
194. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by Farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(11): 5459-63.
195. Martini N, Eloff JN. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). J Ethnopharmacol. 1998; 62(3): 255-63.
196. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett. 2006; 160(2): 171-7.