



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.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme in vitro dos extratos brutos e frações de *Casearia sylvestris* contra dois dos patógenos orais relacionados à cárie dentária.

2.1 Objetivos Específicos

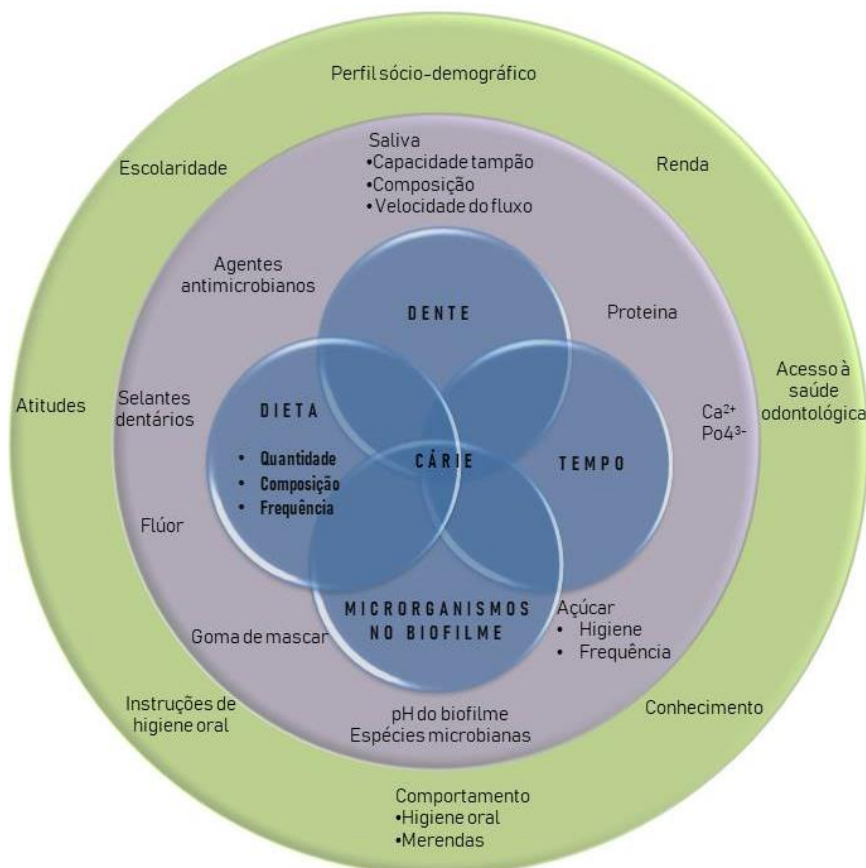
1. Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme (*S. mutans*) dos extratos brutos;
2. Avaliar a atividade antimicrobiana (*S. mutans*) das frações;
3. Avaliar atividade antimicrobiana e antibiofilme (*C. albicans*) dos extratos brutos;
4. Avaliar o efeito de extratos selecionados na atividade de GtfB;
5. Avaliar o desprendimento após a adesão de *S. mutans* à película salivar e à matriz inicial de glucanos tratada com extratos selecionados;
6. Verificar a citotoxicidade de extratos selecionados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença crônica multifatorial que se caracteriza pela degradação do material mineral das estruturas dentárias, chamado de desmineralização ³¹. Essa doença é resultado da interação de microrganismos específicos com constituintes da dieta em biofilmes dentais (conhecidos como placa), fortemente aderidos à superfície dentária ⁶. Vários modelos foram desenvolvidos ³¹⁻³⁴ para evidenciar a multifatorialidade da cárie, assim, essa doença ocorrerá quando houver interação entre todos os fatores, gerando condições favoráveis para que o biofilme se torne cariogênico (Figura 1).

Figura 1- Fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie



Resumo dos fatores de risco que se encontram relacionados ao desenvolvimento da cárie dental. Em verde estão fatores pessoais, em roxo, fatores ambientais da cavidade bucal e em azul, os fatores diretamente implicados na doença.

Fonte: Adaptado de Selwitz et al. ³¹, p.54.

Nesse sentido, é indispensável que a remoção mecânica deste biofilme seja realizada através dos meios mecânicos e químicos, que serão abordados

detalhadamente no item 3.6 Controle do Biofilme Cariogênico. Porém, apesar deste conhecimento, essa doença persiste como um problema mundial e é o principal fator relacionado com a perda da dentição ^{3, 4}.

A cárie dentária não tratada em dentes permanentes foi a condição mais prevalente de todas as descritas para *Global Burden of Disease*, afetando cerca de 2,5 bilhões de pessoas no mundo, enquanto 573 milhões de crianças eram afetadas por lesões cáries não tratada em dentes decíduos ⁵. Esses números provavelmente continuarão aumentando, como resultado do crescimento e envelhecimento da população, bem como do consumo crescente de açúcares e exposição inadequada a fluoretos ^{5, 35}.

Em 2010, os custos de tratamento direto devido a condições orais, incluindo a cárie dentária, foram estimados em US\$ 298 bilhões em todo o mundo, correspondendo a uma média de 4,6% das despesas de saúde globais ³⁶. Os custos indiretos devido a condições orais em todo o mundo totalizaram US\$ 144 bilhões anuais, correspondendo a perdas econômicas dentro do alcance das 10 causas globais mais frequentes de morte ³⁶. O impacto econômico global direto e indireto das condições bucais pode ascender a mais de US\$ 442 bilhões ³⁶. Os valores gastos sugerem que a cobertura universal para cuidados de saúde bucal com base em cuidados dentários convencionais pode ser muito cara para enfrentar a alta prevalência de condições bucais e as medidas paliativas têm um valor limitado para minimizar o impacto causado entre as populações ⁵.

3.2 Biofilme Dental

Grande parte dos ecossistemas microbianos contém uma extensa variedade de microrganismos geneticamente distintos e, a cavidade bucal humana não é diferente. Neste habitat existem aproximadamente 700 espécies bacterianas e, entre 100 e 200 espécies diferentes estão presentes na boca saudável de qualquer indivíduo ³⁷. Ainda são encontrados 74 gêneros de fungos, sendo *Candida* spp o principal ^{38, 39}.

Microrganismos orais em sua forma livre (planctônica, não aderidos a uma superfície) são transportados pelo fluxo salivar para fora da boca e pelo trato digestivo, ainda, são continuamente submetidos a desafios na cavidade oral, como variações de oxigênio e disponibilidade de nutrientes, alterações de pH e as propriedades antimicrobianas da saliva; portanto, a organização de microrganismo orais em

biofilmes desempenha um papel essencial na sua sobrevivência ⁴⁰. A placa dentária humana é um dos sistemas de biofilme mais complexos da natureza, pois está constantemente exposto a desafios ambientais e, portanto, pode servir como um modelo geral para o estudo da biologia de biofilmes ⁴¹.

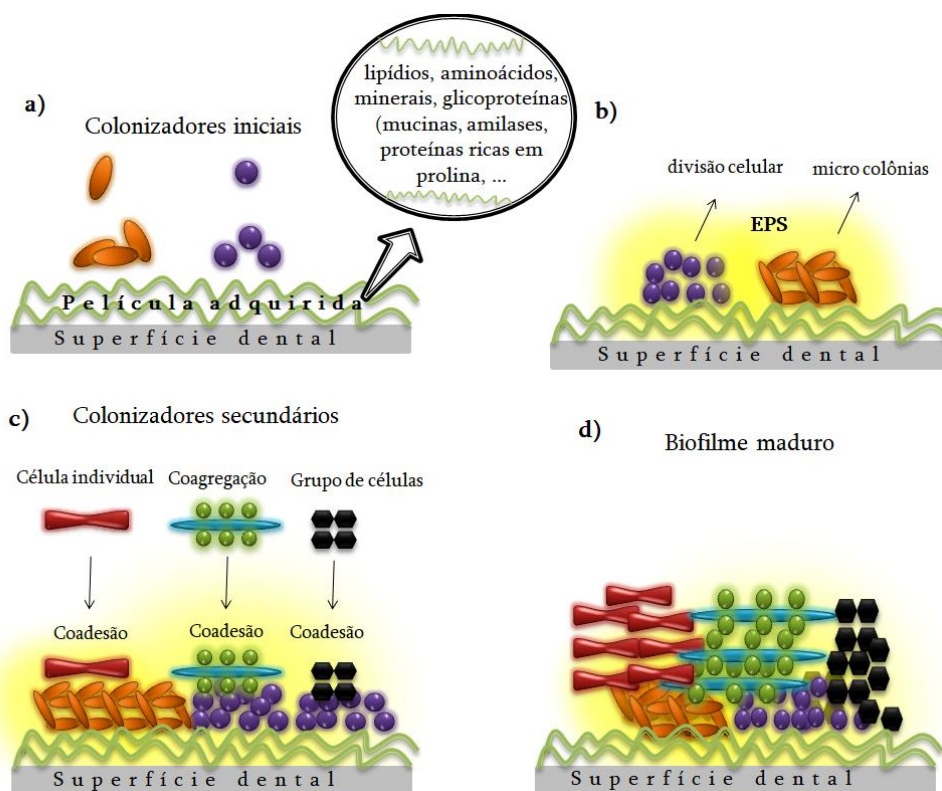
O termo biofilme foi descrito em 1978 ⁴² e em geral é definido como comunidades altamente estruturadas de células microbianas que são firmemente aderidas entre si e a superfícies e enredadas por uma matriz tridimensional (3D) de substâncias poliméricas extracelulares, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos, esta estrutura 3D é conhecida como matriz extracelular ⁴³⁻⁴⁵.

O desenvolvimento de biofilmes em superfícies procede como uma sucessão de eventos de adesão e multiplicação microbiana. A interação entre a saliva e os dentes leva a formação de uma película salivar em suas superfícies, essa película é composta por 99% de água e 1% de compostos orgânicos e inorgânicos, entre eles: lipídios, aminoácidos, minerais, glicoproteínas (mucinas, amilases, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, imunoglobulinas A e G), enzimas de origem microbiana e do hospedeiro (lisozimas, peroxidases) e até produtos bacterianos (glucosiltransferases, DNA extracelular ou eDNA, ácidos lipoteicóicos ou LTA, peptideoglicanos) ⁴⁶⁻⁴⁸. Após a formação da película salivar, ocorre adesão de baixa afinidade de microrganismos colonizadores primários (majoritariamente: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces* spp) a essa película, geralmente em presença de proteína ou outros componentes orgânicos ⁴⁹⁻⁵².

Streptococcus mutans também pode estar presente nesta comunidade colonizadora inicial, embora em número variável, dependendo da dieta do hospedeiro ^{53, 54}. Em condições ambientais adequadas, os colonizadores primários podem então multiplicar-se no substrato dando origem a microcolônias (um conjunto de células estruturadas tridimensionalmente) que sintetizam a matriz do biofilme. Como as condições ambientais mudam dentro do biofilme jovem e o substrato fica coberto por microrganismos, os colonizadores secundários são então capazes de se aderir facilmente aos primários ou a outros microrganismos (e à matriz extracelular sintetizada por eles) para se co-aderirem aos primários criando uma estruturação entre eles; então o biofilme começa a se transformar em uma comunidade multiespécie ^{7, 55}. Atingida a maturação do biofilme formado, os microrganismos que

o compõe podem se desprender e colonizar outras superfícies da cavidade bucal (Figura 2)^{40, 55}.

Figura 2 - Desenvolvimento de biofilmes multiespécies



Coagregação no desenvolvimento de biofilmes multiespécies. (a) Colonização primária de hidroxiapatita coberta por película salivar; (b) crescimento e divisão celular; em amarelo, a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) que conduz ao desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, grupos de células coagregadas e grupos de células iguais; e (d) maturação e formação de mosaicos clonais dentro do biofilme multiespécies.

Fonte: Adaptado de Rickard et al.⁵⁵, p.95.

3.3 Matriz Extracelular do Biofilme

A matriz extracelular é produzida por alguns microrganismos específicos, auxilia na formação e maturação do biofilme, fornece suporte e proteção às células microbianas^{40, 44, 56, 57}. A matriz impede a entrada de substratos para o metabolismo de microrganismos bem como de íons da saliva e também saída de metabólitos do biofilme; ainda, os ácidos produzidos pelos microrganismos podem ficar retidos em nichos acídicos dentro do biofilme porque a matriz impede a neutralização dos ácidos pela saliva, resultando na indução do processo de dissolução do esmalte⁵⁸.

A composição e estrutura da matriz do biofilme podem ser tão variáveis quanto os constituintes microbianos, são influenciados pelas condições ambientais locais e podem mudar com o tempo ^{44, 56}. Exopolissacarídeos (EPS) e outros constituintes salivares e bacterianos, como proteínas, lipídios, lipopolissacarídeos, LTA e eDNA foram identificados nas matrizes de biofilmes bacterianos e podem contribuir para sua organização estrutural e propriedades de difusão ^{7, 57, 59, 60-62}. A matriz é essencial para a existência do biofilme e expressão completa da virulência por patógenos ⁶³.

3.3.1 Exopolissacarídeos

EPS são componentes-chave da matriz em biofilmes orais cariogênicos e são reconhecidos como fatores de virulência envolvidos na patogênese da cárie dentária, fornecem estabilidade mecânica para o biofilme, mediando a aderência a superfície dentária ^{7, 61}. Uma dieta rica em sacarose influencia drasticamente o desenvolvimento do biofilme cariogênico, pois fornece substrato (sacarose e amido) para a produção de EPS na superfície da película ^{6, 7, 64}. Glucosiltransferases (Gtfs) e frutossiltransferases (Ftfs), exoenzimas de *S. mutans*, sintetizam EPS quando sacarose e amido estão disponíveis ^{7, 14}.

Os polímeros formados na superfície fornecem locais de ligação para posterior colonização e acúmulo de *S. mutans* (através de várias proteínas de ligação ao glucano associadas à membrana) e outros organismos ^{65, 66}, incluindo fungos ⁶⁷. Assim, um produto bacteriano na película e nas superfícies microbianas fornece a base inicial da matriz rica em EPS (e locais de ligação) ⁷, influenciando dramaticamente a trajetória de formação de biofilme virulento. A sacarose também pode ser fermentada para produzir ácidos dentro de biofilmes, criando nichos acídicos; outros carboidratos fermentáveis como glicose, frutose e maltose também podem ser convertidos em ácidos, mas raramente servem como substrato para a síntese de EPS ^{7, 68}.

Com o passar do tempo, esses EPS ajudam a construir a matriz 3D que envolve e suporta as células, formando um ambiente altamente coesivo com difusão limitada e nichos acídicos ^{58, 61, 69}. A acidificação da matriz rica em EPS insolúveis favorece o crescimento dos microrganismos acidúricos (tolerantes ao estresse ácido) e essa condição associada à redução de pH na interface dente-biofilme resulta no processo de desmineralização do esmalte dentário, levando ao início clínico da cavitação ^{7, 70, 71}.

3.3.2 DNA extracelular e ácidos lipoteicóicos

eDNA e LTA são encontrados na matriz extracelular em grandes quantidades^{68, 72-74}. Dentro da matriz de biofilmes cariogênicos os nichos são altamente ácidos com valores de pH no intervalo de 4,5-5,5^{48, 58} e, na presença de um pH ácido, eDNA e LTA interagem com EPS na formação de biofilmes e podem afetar a virulência de *S. mutans*⁶².

eDNA é produzido por *S. mutans* através da autólise, um processo de destruição celular programado^{60, 75, 76}, ou pode ser secretado via microvesículas ou vesículas de membrana⁷⁷. LTA pode ser liberado para a matriz durante a lise celular e remodelação da parede celular. Ambas as biomoléculas, eDNA e LTA, podem conferir uma carga negativa à matriz, podendo influenciar suas propriedades de difusão^{69, 78, 79} e assim afetar a atividade de antimicrobianos catiônicos ou agentes antibiofilme⁵⁸.

Assim, eDNA e LTA têm funções importantes juntamente com EPS na construção da matriz extracelular^{62, 80-82} e promoção da aderência bacteriana às superfícies^{53, 72, 81, 83}.

3.4 *Streptococcus mutans*

S. mutans são cocos Gram-positivos e anaeróbios facultativos⁸⁴. Essa espécie desempenha um papel fundamental na modulação da transição de forma não patogênica para biofilmes altamente cariogênicos⁸, embora organismos adicionais também possam estar associados⁹⁻¹¹. Isso ocorre porque *S. mutans* é capaz de prosperar e competir no complexo microbioma do biofilme e contribuir para a patogênese da cárie dental por que: (i) utiliza sacarose da dieta para sintetizar rapidamente os EPS através de glucosiltransferases e uma frutossiltransferase, (ii) adere tenazmente a superfícies revestidas com glucanos, e (iii) é altamente acidogênico e acidúrico^{70, 85}.

Ainda, a capacidade de produção de mutacina pode favorecer a instalação e colonização de *S. mutans* no biofilme dentário aumentando o risco de cárie⁸⁶. Porém, nem todas as cepas dessa espécie são capazes de produzir mutacinas ou biofilme com matriz rica em EPS⁸⁷. *S. mutans* possui dois mecanismos de aderência à superfície dentária, o principal ocorre na presença de sacarose e é guiado pelas exoenzimas Gtfs, que sintetizam EPS e está diretamente relacionada com a cariogenicidade do biofilme^{22, 63}. O segundo mecanismo de aderência ocorre

independente de sacarose via adesinas (i.e., SpaP, Wap, Agl/II) que se ligam a receptores na película.

S. mutans expressa pelo menos três Gtfs (GtfB, GtfC e GtfD), as quais utilizam sacarose (e hidrolisados de amido) para síntese de glucanos solúveis (GtfD e GtfC) e insolúveis (GtfB e GtfC) em água ^{7, 66}. Todas as Gtfs contribuem para a formação de um biofilme virulento, pois além de sintetizarem glucanos, essas enzimas fazem a ligação dos mesmos às superfícies ⁷. O gene *gtfB* (e seu produto GtfB) é um reconhecido fator de virulência associado à patogênese da cárie dentária em roedores e humanos ⁸⁸. Ao ser comparada com as outras Gtfs, a GtfB se liga com maior avidéz aos microrganismos orais (*C. albicans*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *S. mutans*) devido a presença de um terminal com vários grupos carboxila, que promove um agrupamento denso de células, o que reforça a coesão da placa microbiana ^{7, 14, 67}. Na presença de sacarose e amido, GtfB e α -amilase adsorvidas a superfícies (como parte da película), agindo em conjunto, aumentam a síntese de glucanos estruturalmente distintos, que fornecem sítios nas superfícies apatíticas para aumento de aderência microbiana ¹³.

A GtfC encontra-se principalmente como parte da película salivar adquirida e produz glucanos insolúveis e solúveis ⁷. Esta afinidade se deve aos domínios hidrofóbicos que originam interações com macromoléculas salivares específicas encontradas na película, incluindo peroxidase, lisozima e α -amilase ^{7, 14, 89}. GtfD também se encontra na película adquirida, mas em menor quantidade e produz um polissacarídeo solúvel, facilmente metabolizável, que atua como um iniciador para GtfB ⁷. As Gtfs também se ligam a muitas bactérias orais, mesmo aquelas que não sintetizam as Gtfs ^{14, 90, 91} convertendo-as assim em produtores de glucanos ¹⁴. Ainda, Gtfs adsorvem-se às células do fungo *C. albicans*, convertendo-a em de fato produtor de α -glucanos, pois as Gtfs estão ativamente produzindo esses EPS na presença de sacarose ⁶⁷.

3.5 *Candida albicans*

Embora as bactérias compreendam o grupo mais predominante de microrganismos da microbiota oral, muitos fungos também colonizam a cavidade bucal de indivíduos saudáveis ³⁸. *C. albicans* é o organismo fúngico mais comumente detectado na cavidade bucal humana ^{15, 16}, este fungo coloniza superfícies mucosas

e protéticas e são os microrganismos associados às alterações patológicas da mucosa oral sob próteses (estomatite protética) ⁹².

Similar ao que já foi descrito no item 3.2 Biofilme Dental, o biofilme fúngico se inicia pela adesão de células planctônicas às superfícies bióticas (mucosa oral) e/ou abiótica (prótese), seguido de proliferação de células de levedura na superfície do substrato e o início do desenvolvimento de hifas, pois este fungo é polimórfico. Então, o biofilme torna-se maduro, nesta fase o crescimento em forma de levedura é reprimido, o crescimento de hifas se eleva e a matriz extracelular encobre o biofilme ^{93, 94}. Esse aumento do crescimento de hifas via de é crítica para que haja formação significativa de biomassa de biofilme ⁹⁵.

C. albicans também adere às superfícies dentárias, produz EPS, forma biofilmes e é altamente acidogênica e tolerante a ácidos ^{17, 21}. Além disso, se associa a uma variedade de espécies bacterianas patogênicas ^{96, 97}, o que pode levar à formação de comunidades microbianas complexas ^{98, 99}.

As associações fúngico-bacterianas podem ser antagônicas ou cooperativas ^{100, 101}. É cooperativa quando, uma vez juntos dentro de biofilmes, esses organismos fornecem substratos/metabólitos ou fatores de crescimento um do outro. Essa associação ocorre entre *C. albicans*-*S. mutans* e é mediada pelas Gtfs (principalmente GtfB) quando há recursos adequados de sacarose ^{67, 102}. A presença de *C. albicans* no biofilme misto modifica drasticamente o ambiente físico, provoca aumento da produção de EPS ¹⁸ e induz ativação de genes *gtfs* de *S. mutans*. Esta interação aumenta a capacidade de ambos os organismos colonizarem os dentes e potencializa a virulência do biofilme cariogênico ¹⁸. Essas características tornam biofilmes formados por *C. albicans* e *S. mutans* mais difícil de controlar ^{103, 104}.

3.6 Controle Do Biofilme Cariogênico

O método para controle do biofilme cariogênico mais utilizado é a sua remoção mecânica através da higiene oral com escovas dentais (recomendado um mínimo de três vezes por dia) e fio dental (recomendado uma vez no dia) ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Adjunto aos meios mecânicos, o uso do flúor em suas várias preparações é o pilar da prevenção da cárie ¹⁰⁸. O flúor exerce seu efeito principal reduzindo a desmineralização e aumentando a remineralização das lesões precoces ¹⁰⁹, no entanto, não oferece proteção completa contra a doença cárie ¹¹⁰.

O flúor administrado topicamente em vários veículos produziu grandes reduções na prevalência e incidência de cárie dentária, em parte devido ao seu potencial de remineralização. Mas, quando o desafio microbiano é alto e/ou faltam componentes salivares, a remineralização resultante é insuficiente para deter ou reverter o processo de cárie ¹¹¹.

Em associação aos meios mecânicos e à fluorterapia, os agentes químicos como clorexidina, triclosan e óleos essenciais são também utilizados para controle do biofilme cariogênico ¹¹². A clorexidina é considerada padrão-ouro na odontologia, é um agente antimicrobiano de amplo espectro que suprime os níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva, mas é menos eficaz contra biofilmes maduros ²². Sua ineficácia em biofilmes maduros ocorre porque EPS da matriz possuem carga negativa e, portanto, afetam a penetração da clorexidina que tem carga positiva (substância catiônica) para dentro do biofilme ^{58, 113}, esse comprometimento na penetração afeta a atividade antimicrobiana de clorexidina em biofilmes ^{58, 113}.

Ainda, a má alimentação tem um impacto na saúde bucal e na saúde geral, e o manejo do consumo de açúcar refinado tem sido usado por muitos anos para controle da ecologia bucal e proteção contra a cárie. No entanto, o controle da formação de biofilme patogênico através da modificação da dieta é pouco realista, pois a sacarose e o amido compõem a base da dieta da sociedade moderna, e, a combinação destes carboidratos resulta em uma elevação da cariogenicidade da sacarose ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

As limitações das modalidades terapêuticas para o controle/modulação da formação de biofilme dental/oral resultaram no aumento pela busca de abordagens não convencionais. Ainda, outras razões aumentaram este interesse em novas modalidades, como a resistência microbiana, toxicidade a curto e longo prazo, efeitos adversos e colaterais, altos custos para o usuário final, entre outros ²⁴.

As abordagens que estão sob investigação incluem: (i) Modulação do microbioma bucal, manipulando o ambiente oral para favorecer seletivamente o crescimento de espécies benéficas à custa de espécies cariogênicas que causam disbiose (ao invés de matá-las) usando prébióticos e probióticos ¹¹⁷; (ii) Estratégias que rompem a matriz de EPS dos biofilmes orais, e (iii) Uso de componentes bioativos de liberação de fármacos que são desencadeados em ambientes de baixo pH, afetando o processo de cárie com alta eficácia, toxicidade mínima e efeitos terapêuticos de longo prazo ¹¹⁸.

Estas abordagens permitiriam o desenvolvimento de terapias para alvos direcionados e aumentaria a gama de produtos preventivos de cárie, tornando a prevenção menos dependente do flúor. Ainda, como a cárie é causada por metabólitos microbianos, a redução da quantidade e da patogenicidade da placa dental pode funcionar sinergicamente com o flúor e com outros agentes microbianos já conhecidos¹¹⁹.

3.6.1 Produtos naturais para terapias antibiofilme

Ao longo dos tempos, a humanidade se beneficiou de medicamentos naturais para tratar ou prevenir um amplo espectro de doenças. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o uso de plantas medicinais se disseminou não só nos países em desenvolvimento, mas também nos industrializados, como forma complementar do tratamento e prevenção de doenças¹²⁰. Em muitos países, os extratos de plantas têm sido tradicionalmente usados para o tratamento de lesões da mucosa bucal e doenças periodontais, sem qualquer validação científica¹²¹. Os extratos vegetais constituem ricas fontes de novos compostos com ampla variedade de atividades farmacológicas com potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças humanas^{122, 123}. Até o momento, um número muito alto de condições que afetam a saúde bucal pode ser evitado, melhorado e/ou tratado com o uso de medicamentos ou fórmulas à base de produtos naturais²⁴; e há uma gama de medicamentos, enxaguatórios bucais e dentifrícios derivados de produtos naturais disponíveis no mercado ou sob prescrição médica¹²⁴.

No geral, o número de intervenções fitoterápicas na odontologia é bastante limitado quando comparado a medicamentos sintéticos, o que também é verdade para outras áreas das ciências biomédicas²⁴. No entanto, a análise da distribuição global de ensaios clínicos randomizados de intervenções fitoterápicas/produtos naturais na odontologia revela um aumento de cerca de 143% no número de estudos concluídos de 2013 a 2015, destacando o crescente interesse dos pesquisadores e da indústria no desenvolvimento de novas terapias baseadas em produtos naturais²⁴.

Para serem utilizadas como alternativas anti-cáries, é desejável que as terapias à base de compostos naturais tenham um ou mais dos seguintes efeitos: (1) Bloqueio da aderência das Gtfs à película; (2) Inibição da síntese de EPS nas superfícies; (3) Influência da estrutura da matriz EPS; (4) inibição da aderência bacteriana colonização; (5) Perturbação da produção de ácido e mecanismos de adaptação

ácida; (6) Supressão do crescimento de patógenos orais (7) Modificação da ecologia e bioquímica do biofilme e (8) Promoção/manutenção de uma microbiota saudável, evitando disbiose ^{117, 125}.

Ainda, tem sido sugerido que modular a alimentação com prebióticos poderia ajudar na manutenção de uma microbiota saudável, pois a sua ingestão permite mudanças específicas na composição e/ou atividade da microflora residente que conferem benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro ¹²⁶. No entanto, há dados experimentais muito limitados sobre as possíveis funções benéficas de potenciais prebióticos para a saúde bucal. Um exemplo bem estabelecido é a arginina, algumas bactérias transformam este aminoácido em amônia, que é liberada extracelularmente elevando o pH, e conseqüentemente, neutraliza os ácidos formados ¹²⁷. Ensaios clínicos demonstraram que a adição de arginina ao creme dental melhora significativamente os índices de saúde da cárie ¹²⁸. Infelizmente, existem dados experimentais muito limitados sobre as possíveis funções benéficas de outros potenciais prebióticos para a saúde bucal, havendo necessidade de explorar novas moléculas naturais que exerçam ação prebiótica.

O uso de moléculas destinadas a reduzir a expressão de virulência de *S. mutans*, promovendo o desarmamento de suas propriedades de virulência, sem ameaçar sua existência, é uma abordagem atraente, pois oferece uma pressão seletiva reduzida para a resistência a drogas e também evita alterações dramáticas da microbiota residente ^{129, 130}.

3.7 *Casearia sylvestris*

Comumente difundida nas Américas, a *C. sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) é encontrada em diversos países, como Antilhas, Argentina, Brasil, Bolívia, Cuba, México, Peru e Porto Rico ^{131, 132}. No Brasil, é distribuída praticamente por toda a extensão do território, desde o Amazonas (região do rio Tapajós) até o Rio Grande do Sul ^{133, 134}, e também pode ser encontrada em países Asiáticos ²⁸.

Anatomicamente, esta planta apresenta tronco tortuoso, casca de coloração acinzentada a acastanhada, rugosa e com pequenas fendas superficiais. As folhas são alternas lanceoladas até ovaladas ou elípticas, dispostas no mesmo plano do ramo, alternadamente. Possui entre 6-12 cm de comprimento por 3-5 cm de largura. É assimétrica na base e apresenta de cinco a oito nervuras laterais (Figura 3). São brilhantes e dotadas de pequenas glândulas de óleo, visíveis contra a luz ^{134, 135}. As

flores são pequenas, verdes, actinomórficas e hermafroditas, e produz odor imperceptível, néctar de fácil acesso e exposição dos órgãos sexuais. A planta floresce em junho e agosto e seus frutos amadurecem de setembro a novembro. Estes frutos são cápsulas septicidas com sementes envolvidas por aril vermelho (Figura 4)^{134, 135}. Em condições adequadas, *C. sylvestris* é capaz de florescer e frutificar no segundo ano de vida, quando atinge cerca de 1 metro de estatura (Figura 5)¹³². Com uma taxa moderada de crescimento, a planta vive pelo menos 20 anos. Sua propagação natural e artificial geralmente ocorre através de sementes e sua madeira é usada como combustível e também é adequada para construir cercas, postes, estacas, carpintaria rústica e ferramentas de cabo¹³⁴.

Figura 3 - Exemplar de *C. sylvestris* mostrando detalhe das folhas



Fonte: Foto de autoria do Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro (IQ- UNESP, Araraquara). Reprodução autorizada.

Figura 4 - Exemplar de *C. sylvestris* mostrando detalhe das flores e frutos



Fonte: Foto de autoria do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (IQ- UNESP, Araraquara).
Reprodução autorizada.

Figura 5- *C. sylvestris*



Fonte: Foto de autoria do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (IQ- UNESP, Araraquara).
Reprodução autorizada.

No Brasil, *C. Sylvestris* foi explorada por comunidades nativas e passou a ser popularmente conhecida como "guaçatonga", palavra originária da língua tupi-guarani. Outros nomes populares são "erva-de-lagarto", "língua-de-tiu", "cafezinho-do-mato", "corta-lengua", "erva bugre" e "café selvagem" ^{132, 136}. Os extratos de suas folhas

apresentam atividade anti-inflamatória, antiulcerogênica, cicatrizante, citotóxica em linhagens de células tumorais, antiofídica, bem como são utilizados para o tratamento de herpes ^{121, 137-141}. Ainda, é descrito na literatura ação antimicrobiana contra patógenos como fungos (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*) ¹⁴²⁻¹⁴⁴ e bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*) ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Em relação à toxicidade de *C. sylvestris*, estudos in vivo em camundongos, mostraram toxicidade aguda da planta (DL50=1790 mg/kg via intraperitonal em camundongos e DL50 = 1840 mg/kg via oral em ratos) ^{121, 147}.

A composição fitoquímica dessa planta é variada, estudos com extratos de folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (Mata-Atlântica) e var. *lingua* (Cerrado) mostraram que esta planta tem perfil químico com maior expressão de diterpenos e de flavonoides, respectivamente ³⁰. Análises químicas identificaram e isolaram compostos flavonoides glicosilados e uma catequina de amostras de *C. sylvestris*, os compostos foram identificados da seguinte forma: (+) -catechin, quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D glucopyranoside (rutin), isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (isorhamnetin-3-O-neo-hesperidoside, isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (narcissin) e isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranoside ¹⁴⁸. Até o momento, foram identificados e isolados monoterpênos e sesquiterpênos ¹⁴⁹, nor-isoprenóides ¹⁵⁰, triterpênos, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido vanílico, flavonoides ¹⁵¹, neoligninas ¹⁵², ácido elágico e derivados de ácido gálico ¹⁴⁴ e óleos essenciais como b-cariofileno, biciclogermacreno, α -humulene, germacrene B ¹⁵³. Um estudo analisando a fração de éter etílico de um extrato aquoso a frio das folhas, isolaram as seguintes agliconas de flavonoides: quercetina, 4-O-metiléter do canferol e isoramnetina, cumarinas e flavonoides glicosilados ¹⁵⁴. Ainda são descritos mais de 30 diterpenos do tipo clerodano isolados de *C. sylvestris*, dentre eles: as casearinas A-X, a caseargrewiina F e as casearvestrininas A-C ^{137, 143, 150, 155, 156}. Embora *C. sylvestris* apresente este grande arsenal farmacológico ²³, pouco está elucidado quanto à sua atividade contra microrganismos patogênicos encontrados na cavidade bucal ^{26, 27}.

Na odontologia, produtos contendo *C. sylvestris* como princípio ativo são comercializados, como o ANAPYON, indicado como antisséptico e desodorante nas inflamações bucais, laringites, estomatites e gengivites, também indicado para

tratamento de aftas, mau hálito e amigdalites ¹⁵⁷ e um dentifrício a base dessa planta, fabricado pelo Laboratório Panizza ¹⁵⁸. Dessa forma, há indícios de um potencial anticariogênico desta planta. No entanto, não há esclarecimento quanto aos mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana ou antibiofilme destes produtos nem de que bioma brasileiro tais produtos naturais possuem maior eficácia. Portanto, a investigação da ação antimicrobiana e antibiofilme dos extratos brutos e frações de *C. sylvestris* de diferentes biomas poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de terapias direcionadas a fatores que possam diminuir a cariogenicidade por meio de alvos direcionados.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Extratos Brutos e Frações de *C. sylvestris* de Biomas Distintos do Brasil

Para atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, a planta utilizada foi cadastrada no SisGen (Cadastro nº A00892A; ANEXO A). Assim, foram realizadas 3 coletas (originando 3 lotes) de amostras de folhas 134 indivíduos de *C. sylvestris* oriundos de 12 populações de diferentes regiões do Brasil, contemplando diferentes formações dos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal no período entre junho e setembro de 2012 e 2013 (Quadro 1). Dependendo da disponibilidade de material vegetal, coletou-se de 10 a 20 folhas, essas foram desidratadas a 40°C em estufa de ar circulante e armazenadas em sacos plásticos hermeticamente fechados à temperatura ambiente. Em seguida, o material vegetal foi individualmente triturado e pesado para posterior etapa extrativa. Para tanto, 5 g das amostras de cada uma das 12 populações foram extraídas três vezes utilizando-se porções de 30, 15 e 10 mL de um solvente extrator composto por uma mistura de água, etanol e álcool isopropílico (J. T. Baker, EUA) na proporção de 5:3:2, com o auxílio de banho de ultrassom. Entre cada rodada de extração as amostras foram centrifugadas (5000 x g por 5 minutos) e em seguida filtradas ³⁰. Por fim, os extratos foram combinados e liofilizados, resultando em 12 extratos brutos liofilizados, os quais foram armazenados em microtubos de 0,6 mg/mL (APÊNDICE A). Finalmente, os extratos foram solubilizados em 6 mg/mL com 84,15% de etanol (EtOH-Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO) e 15% de dimetilsulfóxido (DMSO- Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO). Os diluentes dos extratos foram previamente testados para verificar em qual concentração de trabalho não afetam o crescimento microbiano (APÊNDICES B e C).

4.1.1 Fracionamento dos extratos brutos

Prepararam-se cartuchos de extração em fase sólida (EFS) contendo 1 g de uma mistura de sílica gel 40-63 µm, 60 Å (Merck, Alemanha) e carvão ativado (LABSYNTH, Brasil; 500 mg de cada um). As colunas foram previamente condicionadas com hexano/acetato de etila 95:5 (J.T.Baker, grade HPLC, ambos) e em seguida cerca de 150 mg das amostras foram aplicadas. Cada fração foi eluída com porções de 10 mL de hexano/acetato de etila 95:5 (fração Hex), acetato de etila 100% (fração AcOet) e metanol 100% (fração MeOH), respectivamente. A seguir, os solventes foram evaporados com auxílio de um concentrador de amostras (Speed Vac

modelo SPD, Thermo Scientific) ³⁰, obtendo-se desta forma as frações secas para os testes propostos neste estudo (APÊNDICE D). As frações foram solubilizadas a 1 mg/mL com 28% de EtOH e 5% de DMSO e 1x PBS (1x *phosphate buffered saline*, pH 7,4).

4.1.2 Caracterização química dos extratos brutos

As análises cromatográficas usaram um equipamento UHPLC-DAD (Ultimate 3000 RS, Dionex) equipado com um desgaseificador, bomba quaternária, amostrador automático, detector de arranjo fotodiodo UV e forno, segundo a metodologia ³⁰. A separação foi conseguida utilizando uma coluna analítica C18 (Phenomenex Kinetex 150 × 2,1 mm, 2,6 µm, 100Å) 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% de B de 0 a 15 min, 25-90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 40 min e retornando às condições iniciais, 10% de B ao longo de 2 min, e mantendo por mais 3 min para recondicionamento da coluna. Os dados espectrais de absorção foram coletados dentro de 45 min de 200-800 nm.

Quadro 1 - Amostras de *C. sylvestris* coletadas em diferentes biomas brasileiros

População ¹	Código	Morfologia ²	Bioma	Tipo Climático		Exposição solar
				Temperatura	Umidade	
Araraquara/SP	ARA/SP	L	Cerrado	Quente	Seco	Alta
São Roque de Minas/MG	SRM/MG	L	Cerrado	Quente	Seco	Alta
Cariri/CE	CAR/CE	L	Ecotone (Cerrado/Caatinga)	Quente	Seco	Alta
Luis Antônio/SP	LUI/SP	L	Ecotone (Cerrado/Mata Atlântica)	Quente	Seco	Alta
Mogi-Guaçu/SP	MOG/SP	I	Ecotone (Cerrado/Mata Atlântica)	Quente	Seco	Alta
Rio Grande/RS	RIO/RS	I	Pampa (Cerrado / Mata Atlântica) ³	Calor ameno	Seco	Alta
Cáceres/MT	CAC/MT	I	Pantanal (Cerrado/área úmida) ³	Quente	Seco	Alta
Campinas/SP	CAM/SP	I	Cerrado (Ciliary Forest)	Calor ameno	Seco	Baixa
Guaramiranga/CE	GUA/CE	S	Mata Atlântica	Quente	Úmido	Baixa
Pacoti/CE	PAC/CE	S	Mata Atlântica	Quente	Úmido	Baixa
Florianópolis/SC	FLO/SC	S	Mata Atlântica	Quente	Úmido	Baixa
Presidente Venceslau/SP	PRE/SP	S	Mata Atlântica (área remanescente)	Quente	Úmido	Baixa

¹Cinco ou seis indivíduos amostrados; ²Morfologia baseada em classificação botânica; L: var. *lingua*; S: var. *sylvestris*; I: morfologia intermediária;

³Essas localidades têm alta disponibilidade de água.

Fonte: Comunicação pessoal da Dra. Paula Carolina Pires Bueno. Dados não publicados.

4.2 Cepas e Crescimento Microbianos

As cepas de *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314 foram utilizadas para análise antimicrobiana e preparação de biofilmes de espécie única. As cepas foram cultivadas em placas de ágar sangue (5% sangue de cordeiro – Laborclin) e incubadas (48 h, 37°C e 5% CO₂; Thermo Scientific, Waltham, USA). Cinco a dez colônias de cada microrganismo foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura: 2,5% triptona com 1,5% de extrato de levedura (TYE; Difco) contendo 1% de glicose (Synth) e incubado (37 °C e 5% CO₂). Após 16 h, uma diluição de 1:20 de cada cultura inicial foi realizada em meio TYE com 1% de glicose, e o crescimento dos microrganismos foi acompanhado longitudinalmente por leituras em espectrofotômetro (220 Bioespectro, Paraná, BR) até o meio da fase exponencial de crescimento, sendo: a densidade óptica ou DO_{540nm} 0,729 (±0,247) e unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) 1,37E+09 (±6,16E+08) para *S. mutans* e DO_{540nm} 0,967 (±0,034) e UFC/mL 1,96E+08 (±3,63E+06) para *C. albicans* SC5314. O inóculo foi preparado com uma população definida (2×10⁶ UFC/mL para ambas as cepas), em TYE com 1% de sacarose para biofilmes e 1% de glicose para análise antimicrobiana.

4.3 Ensaios de Atividade Antimicrobiana

Os ensaios antimicrobianos foram realizados utilizando uma concentração única de 0,50 mg/mL de extratos e 0,25 mg/mL de frações. As concentrações foram selecionadas devido ao rendimento dos extratos e frações e baseadas na literatura, que considera que experimentos com quantidades superiores a 1 mg/mL para extratos ou 0,1 mg/mL para compostos isolados deve ser evitado ^{159, 160}. Nesta concentração de trabalho, o veículo foi 7% EtOH e 1,25% DMSO para os extratos brutos e frações. Em microplacas de 96 poços (Kasvi), cada extrato ou fração ou veículo foram adicionados ao inóculo preparado para atingir 1×10⁶ UFC/mL e as microplacas foram incubadas (24 h, 37°C e 5% CO₂). Devido ao rendimento das frações e para que houvesse volume para todas as ocasiões, as mesmas foram testadas em um volume final de 100 µL ao invés de 200 µL em cada poço. Os controles foram o veículo (EtOH e DMSO; para verificar se os diluentes afetam o crescimento microbiano), o controle de crescimento microbiano (sem tratamento) e o controle sem tratamento e sem inóculo microbiano (controle de esterilidade do meio de cultura). Ainda, foram incluídos controles por tratamento sem inoculação microbiana (para verificar se os tratamentos per se causariam ou não alteração ao meio de cultura; Quadros 2 e 3).

Cada tratamento foi realizado pelo menos em triplicata em quatro ocasiões distintas. Devido ao rendimento das frações, as mesmas foram testadas em um volume final de 100 µL da placa de 96 poços. Após o período de incubação, realizou-se inspeção visual dos poços (turbidez: crescimento microbiano, límpido: sem crescimento) e a DO_{562nm} foi medida num leitor de placas ELISA (Biochrom Ez, Cambourne, UK). No entanto, tanto os dados de inspeção visual como as leituras de DO foram inconsistentes nas repetições do mesmo experimento e em diferentes experimentos (inclusive nos controles de tratamentos sem inóculo microbiano); portanto, esses dados não foram mostrados. É relatado que tentativas de determinar a turvação das culturas com um leitor de microplacas apresentaram falhas quando utilizado para compostos naturais (como observado por inspeção visual), pois, com alguns organismos de teste, as células aglomeraram-se no fundo do poço e, com outros organismos, as células permanecem em suspensão ¹⁶¹. Ainda, a precipitação de compostos presentes em extratos pode gerar turbidez dos poços, dificultando a interpretação dos dados ¹⁶¹. Assim, essas duas análises não refletiram a real atividade antimicrobiana dos tratamentos (especialmente extratos). Então, uma alíquota de cada poço foi utilizada para uma diluição em série 1:10 (10^{-0} a 10^{-5}), em solução salina a 0,89% (NaCl; Synth), para determinar o UFC/mL por plaqueamento em placas de ágar sangue. Após a incubação (48 h, 37°C e 5% CO₂), as colônias foram contadas para obter UFC/mL e calcular o log e a porcentagem de inibição do crescimento microbiano para cada extrato e fração, comparado ao controle veículo.

Quadro 2 - Volumes adicionados de cada tratamento para determinação de atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos brutos

Grupos	Volumes utilizados para tratamento dos poços
Extratos brutos	16,67 µL dos extratos + 83,33 µL de meio + 100 µL do inóculo preparado
Controle Veículo	16,67 µL de estoque veículo (425 µL de EtOH + 75 µL de DMSO) + 83,33 µL de meio + 100 µL do inóculo preparado
Controle de crescimento microbiano	100 µL do inóculo preparado + 100 µL meio
Controle de esterilidade do meio de cultura	200 µL meio
Controle por tratamento (sem inoculação microbiana)	16,67 µL dos extratos + 83,33 µL de meio

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 3 - Volumes adicionados de cada tratamento para determinação de atividade antimicrobiana das frações

Grupos	Volumes utilizados para tratamento dos poços
Frações	25 µL das frações + 25 µL de meio + 50 µL do inóculo preparado
Controle Veículo	25 µL de estoque veículo (425 µL de EtOH + 75 µL de DMSO) + 25 µL de meio + 50 µL do inóculo preparado
Controle de crescimento microbiano	50 µL do inóculo preparado + 50 µL meio
Controle de esterilidade do meio de cultura	100 µL meio
Controle por tratamento (sem inoculação microbiana)	25 µL das frações + 75 µL de meio

Fonte: Elaboração própria.

4.4 Ensaios de Atividade Antibiofilme

Para análises antibiofilme, também se utilizou a concentração única de 0,50 mg/mL de cada extrato por ser um estudo de prospecção inicial. Para a formação de biofilmes, as cepas foram cultivadas até o meio da fase exponencial de crescimento, descrita acima. O inóculo de biofilme foi preparado para obtenção de 1×10^6 UFC/mL o meio de cultura TYE com 1% sacarose e adicionado em microplacas de 96 poços com cada extrato ou veículo, seguido por incubação (24 h, 37°C e 5% CO₂; Quadro 2). Cada tratamento foi realizado pelo menos em triplicata em quatro ocasiões distintas.

Após o período de incubação, realizou-se inspeção visual dos poços (turbidez: crescimento microbiano, límpido: sem crescimento) e, as microplacas foram colocadas num agitador orbital (5 min, 37°C e 75 rpm; Quimis, São Paulo, BR). Em seguida, o meio de cultura foi removido e os biofilmes remanescentes foram lavados três vezes com NaCl a 0,89% para remover as células não aderidas.

4.4.1 Biomassa de biofilmes após os tratamentos

Os biofilmes lavados foram mantidos na placa e 50 µL de solução aquosa de cristal violeta a 1% foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 35 min, os poços corados foram lavados com água MilliQ e secos ao ar durante 60-90 min. Em seguida, os poços corados por cristal violeta foram eluídos com 200 µL EtOH a 99% e a placa incubada no agitador orbital (5 min, 37°C e 75 rpm; Quimis, São Paulo, BR). Uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para outra microplaca e a DO_{570nm} foi medida no leitor de placas de ELISA.

4.4.2 População microbiana dos biofilmes após tratamentos

Os biofilmes lavados foram retirados da placa com o auxílio de uma pipeta/ponteira (Eppendorf) e 200 μ L de NaCl a 0,89%, e transferidos individualmente para microtubos estéreis. Cada poço foi lavado com mais 200 μ L de solução salina, que foram transferidos para o tubo correspondente já contendo 200 μ L de suspensão de biofilme. Este processo foi realizado até atingir um total de suspensão de cada biofilme de 1 mL. Uma alíquota de cada microtubo foi utilizada para diluição em série 1:10 (10^{-0} a 10^{-5}). Então, alíquotas de cada uma das diluições foram semeadas em duplicata em placas de ágar sangue e incubadas (48 h, 37 °C e 5% CO₂) para a contagem de colônias e cálculo do número do log e a porcentagem de UFC/mL de cada extrato, comparado ao controle veículo.

4.5 Efeito de Extratos Selecionados na Formação Inicial da Matriz de Glucanos (Atividade de GtfB) e no Desprendimento de *S. mutans* após a Adesão à Película Salivar e à Matriz Inicial de Glucanos

4.5.1 Purificação do GtfB

A enzima GtfB foi purificada a partir do sobrenadante de cultura de *Streptococcus milleri* KSB8, esta cepa foi modificada pela introdução do gene *gtf* de *S. mutans* em um plasmídeo para produzir GtfB, seguindo a metodologia publicada ^{66, 162}. Os procedimentos de purificação foram realizados utilizando tampões contendo dois inibidores da protease como conservantes. Os inibidores foram PMSF (concentração final 0,1 mM) e azida sódica (NaN₃, concentração final de 0,02%). GtfB foi purificada utilizando uma coluna de cromatografia contendo esferas de hidroxiapatita (seguindo metodologia detalhada por Venkitaraman et al.⁶⁶. Após a purificação, a enzima foi verificada em gel de acrilamida (SDS-PAGE) e corada com nitrato de prata. Alíquotas da enzima foram armazenadas a -80 °C até o uso.

4.5.2 Formação de película salivar sobre superfície de hidroxiapatita

Utilizaram-se esferas de hidroxiapatita (HA) (Macro-Prep Hydroxapatite Cerâmica Tipo I 80 μ m; BioRad) como superfície de formação de película, para mimetizar o esmalte dentário. Estas esferas foram revestidas com saliva para formação de película adquirida (SHA), seguindo um protocolo anterior ¹⁶³. A saliva total estimulada foi obtida a partir de 1 voluntário saudável, diluída 1:1 com tampão de

adsorção [tampão AB: Tampão AB – 0,05M KCl; 0,02M KPO₄; 0,02M CaCl₂; 0,02M MgCl₂, 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo - Sigma), em DD-H₂O, pH 6,5] e centrifugada (4000 rpm, 20 min e 4°C - Eppendorf, Centrífuga 5810R) e esterilizada por filtração (0,22 µm filtro de membrana de polietersulfona de baixa ligação de proteína) ¹⁶³. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (CAAE: 68161417.0.0000.5416; ANEXO B).

Alíquotas de 500 µL de saliva foram adicionadas a microtubos contendo esferas de HA pré-lavadas e esterilizadas, seguido de incubação (40 min, 37°C e 24 rpm). Em seguida, o sobrenadante de saliva foi removido e o conteúdo de cada tubo foi submetido a lavagens com tampão AB (com PMSF e NaN₃). As amostras de película salivar sobre superfície de hidroxiapatita (sHA) estavam prontas para serem usadas nas etapas descritas a seguir.

4.5.3 Formação inicial da matriz de glucanos e tratamentos para avaliar a inibição da síntese de glucanos via GtfB

Para esta análise, utilizaram-se os extratos promissores (FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP) para atividade antibiofilme e antimicrobiana contra *S. mutans*. As amostras de sHA foram obtidas como descrito acima. Então, 500 µL de enzima GtfB foram adicionados a cada tubo seguido de incubação (40 min, 37°C e 24 rpm) e 3 lavagens com tampão AB (com PMSF e NaN₃). Em seguida, 500 µL de extratos (0,50 mg/mL) ou controles foram adicionados. Os tubos foram incubados (30 min, 37°C e 24 rpm) e lavados 3 vezes com tampão AB (com PMSF e NaN₃). Em seguida, 500 µL de substrato de sacarose (100 mM de sacarose; 20 µM de dextrano 10,200; 0,01% de NaN₃) foram adicionados a cada tubo seguido de incubação (4 h, 24 rpm e 37°C). Para interromper a síntese de glucanos e para precipitar os glucanos formados, 500 µL de EtOH a 99% foi adicionado em cada tubo e estes foram incubados (18 h e 20°C). Depois disso, foram lavados com EtOH a 70% para remover o excesso de sacarose não incorporado aos glucanos sintetizados. Os tubos foram transferidos para um concentrador de amostras (Speed Vac Concentrator RVC 2-18 CD Plus, Christ) para secagem durante 3 h. Então, foi adicionado 200 µL de NaOH 1N e os tubos foram incubados (2 h, 37°C e 300 rpm) para solubilização dos glucanos. Após, este volume foi transferido para um novo tubo e mais 200 µL de NaOH 1N foram adicionados aos tubos contendo as esferas tratadas e foram novamente incubados (2 h, 37°C e 300 rpm). Em seguida, este volume foi transferido para os tubos correspondentes para

obter um volume final de 400 µL. A quantificação dos glucanos formados foi realizada via ensaio fenol e ácido sulfúrico usando glicose como curva padrão ¹⁶⁴.

4.5.4 Desprendimento de *S. mutans* após a adesão à película salivar e glucanos tratados com extratos selecionados

Os microrganismos foram cultivados até o meio da fase exponencial de crescimento, como descrito no item 4.2 Cepas e Crescimento Microbianos. Quando as culturas atingiram a DO desejada, foram centrifugadas (4000 x g por 20 min; Eppendorf, Centrífuga 5810R), lavadas com NaCl 0,89%, este processo foi realizado 2 vezes e ao final, as culturas foram ressuspensas em NaCl 0,89% no mesmo volume inicial. As culturas foram sonicadas com sonda (30 seg, 7 watts por 3 vezes; Sonicador modelo Q125, QSonica, Newtown, USA). A DO_{540nm} foi verificada para ajustar a concentração para 2x10⁶ UFC/mL.

4.5.4.1 Adesão de *S. mutans* à película salivar (sHA)

Amostras de sHA foram obtidas como descrito acima (item 4.5.2). Em seguida, 500 µL dos extratos FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP (0,50 mg/mL) ou controles foram individualmente adicionados a cada tubo. Os microtubos com os tratamentos foram incubados (30 min, 37°C e 24 rpm) e lavados 3 vezes com tampão AB (com PMSF e NaN₃). Em seguida, 500 µL de cultura de microrganismos (2x10⁶ UFC/mL) foram adicionados a cada tubo. Após a incubação (1 h, 37°C e 24 rpm), os tubos foram lavados 3 vezes com tampão AB (com PMSF e NaN₃) para remover as células não aderidas. Cada amostra foi ressuspensa com 1000 µL de tampão AB (com PMSF e NaN₃) e sonicado com sonda (30 seg, 7 watts por 1 vez) para remover as células aderidas à sHA. Uma alíquota de cada suspensão foi utilizada para uma diluição em série 1:10 (10⁻⁰ a 10⁻³) em NaCl a 0,89% para determinar o número de UFC/mL através de plaqueamento em placas de ágar sangue (48 h, 37°C e 5% CO₂). Esta análise verifica se os extratos utilizados são capazes de inibir a aderência de microrganismos à película salivar, mas principalmente, se as células do microrganismo que se aderiram à película tratada podem ser removidas da superfície mais facilmente pelo estímulo mecânico, interrompendo assim o primeiro estágio de formação do biofilme.

4.5.4.2 Adesão de *S. mutans* à matriz inicial de glucanos (gsHA)

Amostras de sHA foram obtidas como descrito acima (item 4.5.2). Em seguida, 500 µL de enzima GtfB foi adicionado a cada tubo, seguido por incubação (40 min, 37°C e 24 rpm) e lavagem com tampão de AB (com PMSF e NaN₃) por 3 vezes. Após, 500 µL de substrato de sacarose contendo os extratos (0,50 mg/mL) ou controles foram adicionados a cada tubo e as amostras foram então incubadas (4 h, 37°C e 24 rpm). Após a incubação, 3 lavagens foram realizadas com tampão AB (com PMSF e NaN₃) para remover o excesso de sacarose não incorporado aos glucanos sintetizados. Posteriormente, 500 µL de cultura do microrganismo (2x10⁶ células/mL) foram adicionados a cada tubo, seguido de incubação (1 h, 37°C e 24 rpm) e 3 lavagens com tampão AB (com PMSF e NaN₃) para remover os microrganismos não aderidos. Cada amostra foi ressuspensa com 1000 µL de tampão de AB (com PMSF e NaN₃) e sonicadas com sonda (30 seg, 7 watts por 1 vez) para remover as células não aderidas à sHA. Então, uma alíquota de cada suspensão foi usada para uma diluição em série 1:10 (10⁻⁰ a 10⁻³) para determinar o número de UFC/mL por plaqueamento em placas de ágar de sangue (48 h, 37°C e 5% CO₂). Esta análise verifica se os extratos utilizados são capazes de inibir a aderência de microrganismos à matriz inicial de glucanos, mas principalmente, se as células do microrganismo que se aderiram aos glucanos tratados podem ser removidas pelo estímulo mecânico mais facilmente da superfície, interrompendo assim o estágio inicial de formação do biofilme.

4.6 Citotoxicidade dos Extratos Seleccionados

4.6.1 Cultura celular

Foram realizadas culturas de células com a linhagens de queratinócitos bucais espontaneamente imortalizados (NOK-si)¹⁶⁵, cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, EUA) com 2 mM de glutamina; contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Grand Island, NY, EUA), penicilina G (10.000 µg/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e anfotericina (25 µg/mL) (Invitrogen) em incubadora (CO₂ a 5%, 37°C). As células foram cultivadas até atingirem a confluência (90%), lavadas com tampão fosfato PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 3,0 mM, Na₂HPO₄ 4,30 mM, KH₂PO₄ 1,40 mM), removidas com solução de tripsina (0,05%)/EDTA (0,53 mM) (Invitrogen) e então submetidas a centrifugação a 400 x g

por 5 min. As células foram ressuspensas em meio de cultura e replaqueadas. O meio foi trocado a cada dois ou três dias. Para os experimentos foram usadas células entre a 3ª e 8ª passagem. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em poços de microplacas de 96 poços ($2,0 \times 10^4$ células/poço). A placa foi incubada (24 h, 37°C e 5% CO₂).

4.6.2 Ensaio de viabilidade celular – MTT

A citotoxicidade resultante da presença de tratamentos [extratos e controles veículo, controle de morte (0,11% Triton X-100) e controle sem tratamento (controle de viabilidade celular)] sobre as células em monocamada foi determinada pelo ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazolio brometo] (Sigma). Este ensaio foi empregado para cultura de células em monocamadas, 1 h após o contato com os extratos e controles, suplementado com SFB 10%, penicilina G (10.000 µg/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e anfotericina (25 µg/mL). Após o período de incubação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS (pH 7,4), e incubadas por 4 h a 37°C com 250 µL de solução de MTT (5,0 mg/mL). Em seguida os cristais de formazam foram solubilizados em 250 µL de 2-propanol adicionados a cada poço. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 562 nm (Reader 400 EZ – Biochrom). Foram realizadas 2 ocasiões experimentais com 4 replicatas por ocasião (n=8). Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle sem tratamento (controle de viabilidade celular).

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA), utilizando um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados dos extratos para atividade antimicrobiana, antibiofilme na atividade de GtfB, para desprendimento de *S. mutans* após adesão à película salivar e à matriz inicial de glucanos e para citotoxicidade apresentaram distribuição não normal e foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Além disso, os resultados de atividade antimicrobiana para as frações apresentaram distribuição dos dados normal e foram analisados por ANOVA two-way, considerando os fatores bioma e fração, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

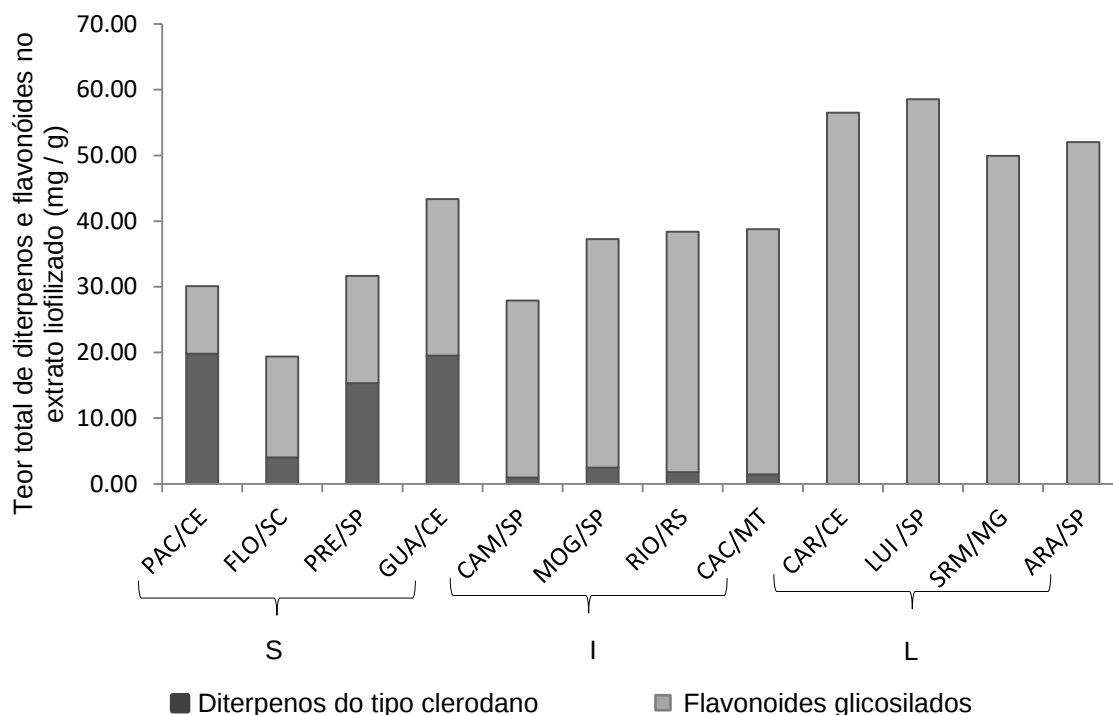
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Química de Extratos Brutos de *C. sylvestris* de Distintos Biomas Brasileiros

Em um estudo anterior, desenvolveu-se um método analítico utilizando cromatografia líquida e quimiometria para avaliar e diferenciar duas variedades de *C. sylvestris* Swartz (Salicaceae) do Estado de São Paulo (Brasil) com base nos perfis secundários de metabólitos. Anteriormente, os estudos analíticos diziam respeito apenas à análise de diterpenos do tipo clerodano e, posteriormente, este método também foi aplicado para descrever a composição de flavonoides das variedades *C. sylvestris* e analisar os extratos da composição de folhas de outros estados brasileiros¹⁴⁸. Então, uma estratégia foi empregada para simultaneamente extrair e detectar o maior número de compostos de ambas as classes químicas. Assim, dois picos foram selecionados a partir dos cromatogramas resultantes e incluíram tanto os compostos fenólicos (mais precisamente, flavonoides glicosilados, detectados a 254 nm) quanto os diterpenos do tipo clerodano, detectados a 235 nm³⁰.

Os resultados mostraram que as variedades apresentaram uma distribuição de acordo com seus ecossistemas originais, sugerindo uma forte correlação com os principais metabólitos encontrados em cada grupo de espécies. Além das diferenças morfológicas inerentes, também foi possível observar diferenças na composição do metabólito secundário dentro de cada grupo, dependendo do local onde as amostras foram coletadas³⁰. Assim, extratos de *C. sylvestris* var. *sylvestris* (PAC/CE, FLO/SC, PRE/SP e GUA/CE), utilizados no presente estudo, apresentam menor teor de diterpenos do tipo clerodano e maior teor de flavonoides glicosilados. Os extratos de morfologia intermediária (CAM/SP, MOG/SP, RIO/RS e CAC/MT) apresentam maior teor de flavonoides glicosilados e pequeno teor de diterpenos do tipo clerodano, enquanto extratos de var. *lingua* (CAR/CE, LUI/SP, SRM/MG e ARA/SP) apresentam o maior teor maior de flavonoides glicosilados (Figura 6).

Figura 6- Quantificação de diterpenos do tipo clerodano e flavonoides glicosilados por extratos de *C. sylvestris* de distintos biomas brasileiros



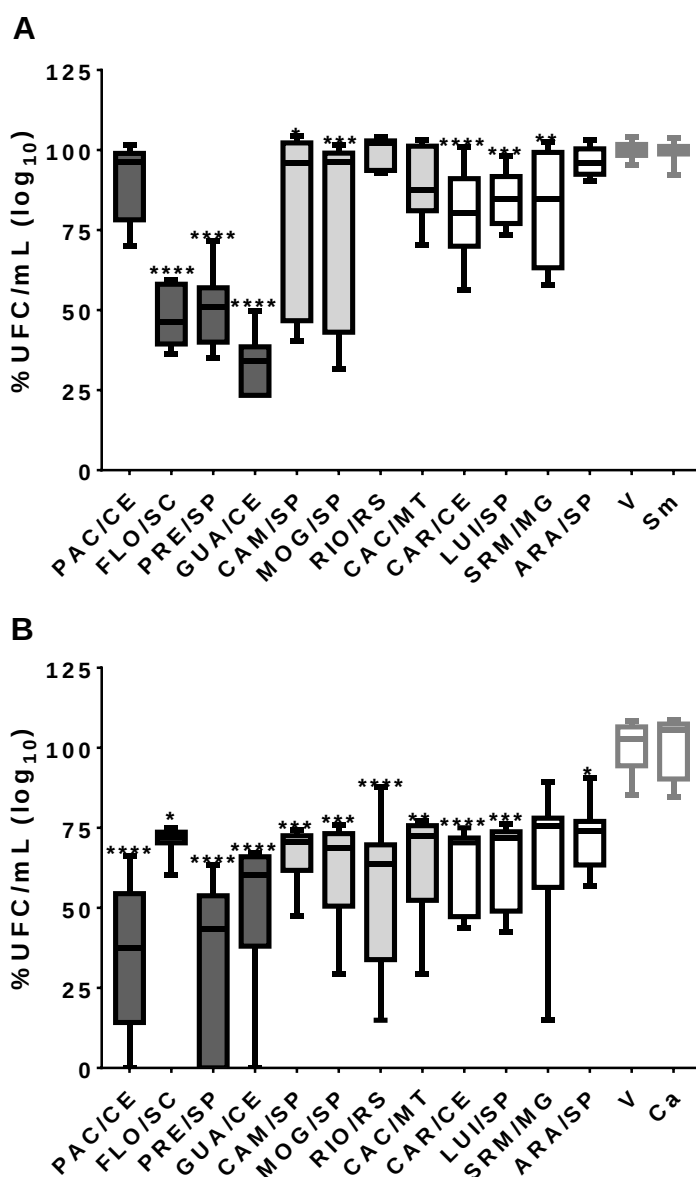
As letras S, I e L indicam as variedades *sylvestris*, intermediária e *lingua*, respectivamente.

Fonte: Comunicação pessoal da Dra. Paula Carolina Pires Bueno. Dados não publicados.

5.2 Atividade Antimicrobiana

Os dados de UFC/mL foram convertidos para $\log_{10}$ e subsequentemente em porcentagem em relação ao veículo controle (V). Isto foi realizado para avaliar quais extratos na concentração testada inibiram >50% das contagens de células viáveis por cepas testadas (IC_{50} ou ≥ 3 logs)¹⁶⁶. Reduções significativas na população microbiana de *S. mutans* foram observadas para FLO/SC (redução de 53,84%), GUA/CE (redução de 65,91%) e PRE/SP (redução de 48,93%) *versus* (vs.) o veículo controle ($p < 0,0001$; Figura 7A). Houve também uma redução significativa na população microbiana de *C. albicans* quando tratada com PAC/CE (redução de 50,3%) e PRE/SP (redução de 52,98%) vs. V ($p = 0,0001$; Figura 7B). Esses extratos pertencem à var. *sylvestris* e contemplam o bioma Mata Atlântica.

Figura 7- Atividade antimicrobiana de 12 extratos de *C. sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *S. mutans* (A) e *C. albicans* (B)



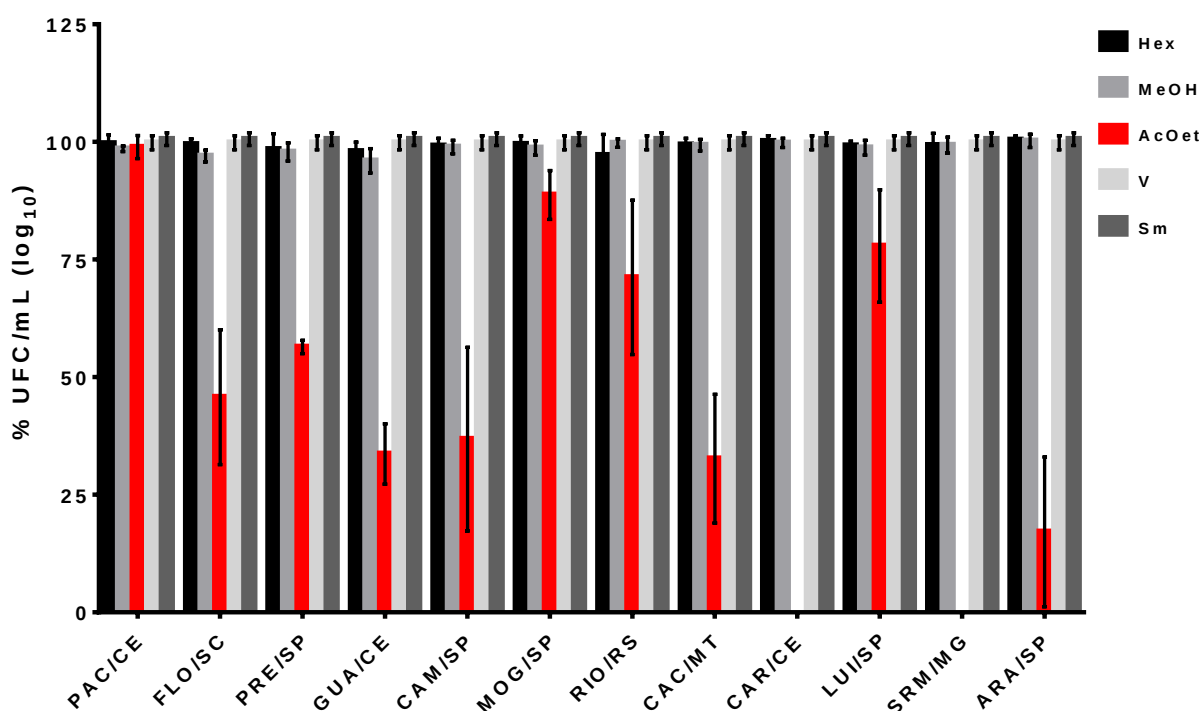
Os dados descritos são as medianas, representadas pelos traços e os intervalos interquartis, representados pelas caixas. As barras de erro indicam os valores máximos e mínimos. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida considerando o controle veículo (V) como 100%. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas de um extrato específico vs. controle veículo (V), onde: **** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn). O controle de crescimento de cada espécie é representado por Sm para *S. mutans* e Ca para *C. albicans*. As cores das barras do gráfico representam a variedade a que pertencem os extratos, sendo, em cor cinza escuro: var. *sylvestris*; cinza claro: var. intermediária e branco: var. *lingua*.

Fonte: Elaboração própria.

A atividade antimicrobiana contra *S. mutans* foi também avaliada para as 36 frações dos extratos, sendo 3 tipos de fração por extrato (MeOH, AcOEt e Hex). As

frações acetato de etila de todos os extratos reduziram a população microbiana de *S. mutans* (vs. V; $p < 0,0001$), exceto PAC/CE ($p > 0,05$). As frações acetato de etila ARA/SP, CAR/CE e SRM/MG causaram maior redução na viabilidade da população de *S. mutans* (82,91%, 92,76% e 100%, respectivamente, vs. V) em comparação às demais frações acetato de etila (Figura 8). Os extratos à que pertencem estas frações são da var. *lingua* e contemplam os biomas Cerrado e Ecotone (Cerrado/Caatinga), ainda, embora expressem maior teor de flavonoides glicosilados, o acetato de etila é um solvente com polaridade ótima para extrair os diterpenos, principalmente as casearinas e portanto, os flavonoides ficam retidos no cartucho de extração e a fração resultante apresenta então, maior teor de diterpenos do tipo clerodano em relação aos flavonoides glicosilados.

Figura 8- Atividade antimicrobiana das 3 frações distintas de *C. sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *S. mutans*



Os dados descritos são as médias e as barras de erro correspondem ao desvio padrão. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida considerando o controle veículo (V) como 100%. Houve diferença estatisticamente significativa entre a fração acetato de etila (AcOet) vs. controle veículo (V) para todas, exceto PAC/CE (two-way ANOVA entre os fatores bioma e fração mostrou que a interação entre os fatores é significativa por fator ($p < 0,0001$; bioma $p < 0,0001$; fração $p < 0,0001$, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey; $p > 0,05$).

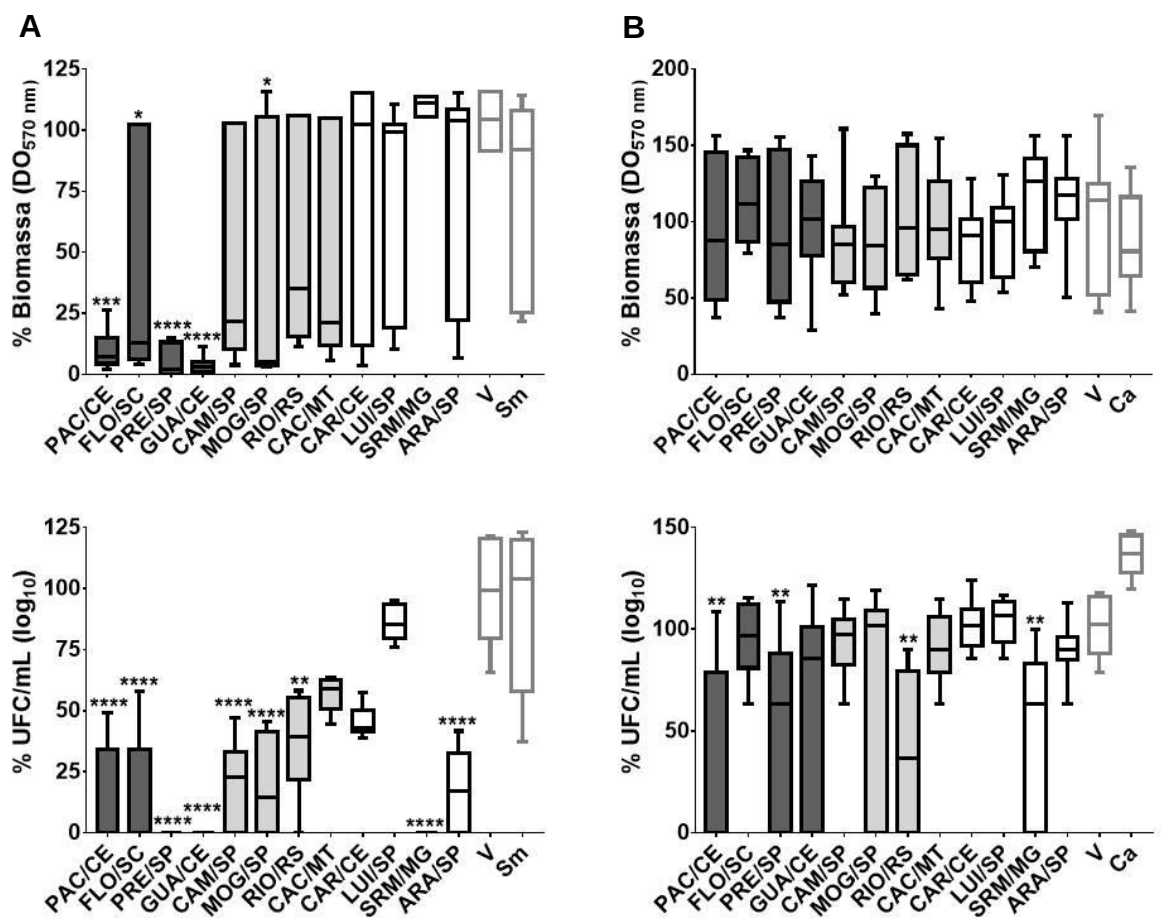
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Atividade Antibiofilme

Os dados de biofilme foram convertidos em porcentagens e os extratos que reduziram a biomassa do biofilme e/ou as contagens de microrganismos viáveis em média mais de 50% foram considerados promissores para testes contra mecanismos de virulência específicos. Quando comparado ao controle veículo, a maior redução de biomassa de *S. mutans* foi observada em biofilmes tratados com os extratos GUA/CE (redução de 95,87%) PAC/CE (91% de redução) e PRE/SP (redução de 99,76%) ($p < 0,0001$; Figura 9A). Reduções significativas na contagem viável da população de *S. mutans* foram observadas para ARA/SP, CAM/SP, FLO/SC, GUA/CE, MOG/SP, PAC/CE, PRE/SP e SRM/MG (vs. V; $p < 0,0001$). No entanto, biologicamente, as reduções mais significativas foram para os biofilmes tratados com GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP, que apresentaram redução média de 100% nas contagens de células viáveis.

Os biofilmes de *C. albicans* tratados com PAC/CE (redução de 66,36%), PRE/SP (redução de 52,51%), RIO/RS (redução de 59,12%) e SRM/MG (redução de 55,8%) mostraram redução das contagens de células viáveis de *C. albicans* (vs. V; $p < 0,0095$, Figura 9D), mas quão importante foi essa redução precisa ser investigada devido à alta variabilidade. Os dados de biomassa também apresentaram alta variabilidade e não foram identificadas diferenças entre tratamentos com extratos e controle veículo (Figura 9B). Estes resultados não eram esperados e podem ser atribuídos à diferença morfológica entre os microrganismos eucarióticos e procarióticos testados e os fatores de virulência de *C. albicans*. Nota-se que os extratos apresentam maior efeito sobre biofilmes de *S. mutans* do que contra os de *C. albicans*, confirmando a diferença na ação dos extratos entre esses microrganismos, uma vez que um é uma bactéria Gram-positiva, enquanto o outro é um fungo.

Figura 9- Atividade antibiofilme de 12 extratos de *C. sylvestris* de distintos biomas brasileiros contra *S. mutans* e *C. albicans*



Os dados de biomassa obtidos pelo método do cristal violeta são mostrados em A e B para *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente. Os dados de população microbiana são mostrados em C e D para *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente. Os dados descritos são as medianas, representadas pelos traços e os intervalos interquartis são representados pelas caixas. As barras de erro indicam os valores máximos e mínimos. A porcentagem de viabilidade celular e biomassa foram obtidas considerando o controle veículo (V) como 100%. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas de um extrato específico vs. controle veículo (V), onde: **** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn). O controle de crescimento de cada espécie é representado por Sm para *S. mutans* e Ca para *C. albicans*. As cores das barras do gráfico representam a variedade a que pertencem os extratos, sendo, em cor cinza escuro: var. *sylvestris*; em cinza claro: var. intermediária e; em branco: var. *lingua*.

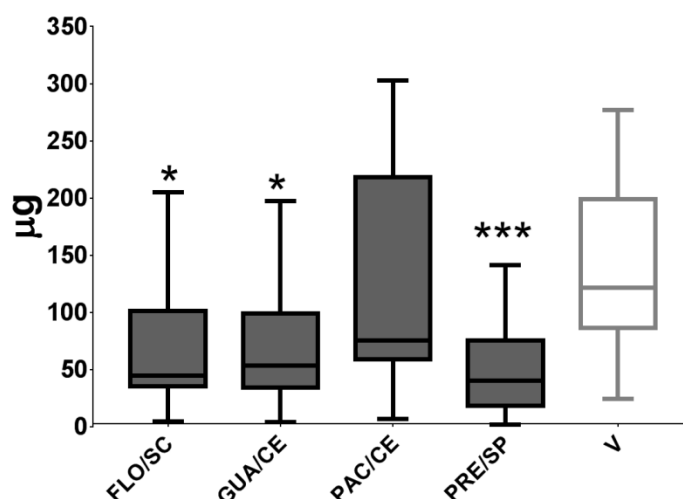
Fonte: Elaboração própria

5.4 Efeito de Extratos Seleccionados na Atividade de GtfB

O efeito dos extratos na atividade de GtfB de *S. mutans* foi avaliado para tratamentos com os extratos FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP, pois esses quatro extratos apresentaram melhores resultados para a análise antimicrobiana e

antibiofilme. Os dados de 3 experimentos em triplicata, com três leituras por replicata estão representados na Figura 10. Os extratos FLO/SC, GUA/CE e PRE/CE reduziram a quantidade de glucanos formados por GtfB (vs. V; $p \leq 0,0136$), porém, PAC/CE não afetou a quantidade de glucanos ($p = 0,6032$).

Figura 10- Efeito dos extratos FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP na atividade de GtfB



Os dados descritos são as medianas, representadas pelos traços e os intervalos interquartis, representados pelas caixas. As barras de erro indicam os valores máximos e mínimos. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas de um extrato específico vs. controle veículo (V), onde: ** $p \leq 0,0136$ e *** $p = 0,0002$ (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn). Apenas o extrato PAC/CE não afetou a atividade de GtfB ($p = 0,6032$). As cores das barras do gráfico representam a variedade a que pertencem os extratos, sendo, em cor cinza escuro: var. *sylvestris*.

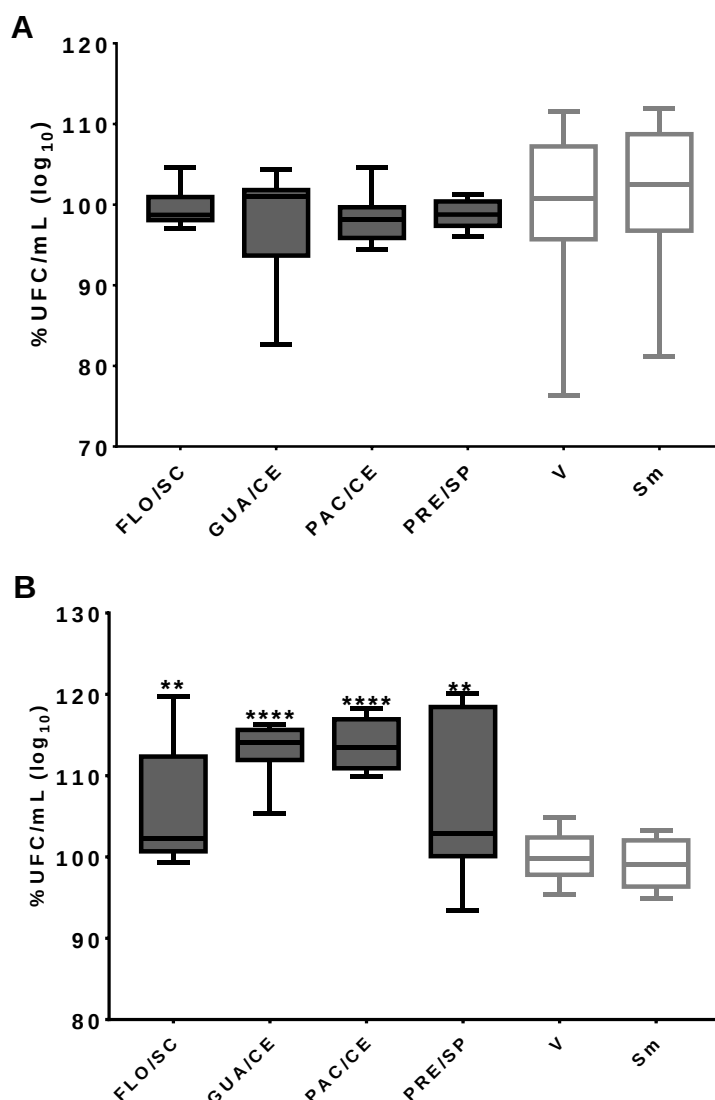
Fonte: Elaboração própria

5.5 Desprendimento de *S. mutans* Após Adesão à Película Salivar e à Matriz Inicial de Glucanos Tratada com Extratos Seleccionados

A quantificação de células de *S. mutans*, que foram removidas pelo estímulo mecânico após adesão das mesmas à película salivar e aos glucanos, foi avaliada para tratamentos com os extratos FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP, pois esses quatro extratos apresentaram melhores resultados para a análise antimicrobiana e antibiofilme. Os dados desta análise são apresentados na Figura 11. Nenhum extrato promoveu redução significativa da remoção de células aderidas à película (vs. V; $p > 0,05$; Figura 11A); assim, esses extratos não modificam a película per se. Entretanto, um maior número de células de *S. mutans* foi removido após adesão à matriz de

glucanos quando tratados por esses extratos (vs. V; $p \leq 0,0031$; Figura 11B). Portanto, os quatro extratos poderiam modificar os glucanos formados na superfície de hidroxiapatita com película e essa modificação poderia enfraquecer a adesão de *S. mutans* à matriz inicial de glucanos, facilitando a remoção mecânica das células.

Figura 11- Desprendimento de *S. mutans* após adesão à película salivar e à matriz inicial de glucanos tratada com extratos selecionados

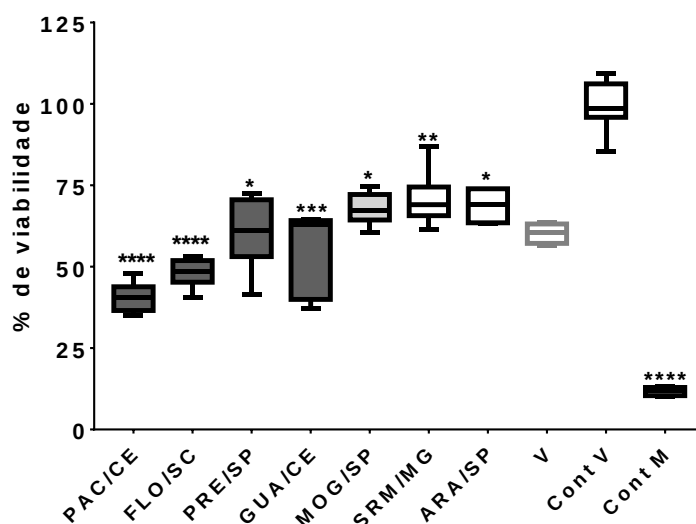


Os dados de desprendimento após adesão de *S. mutans* à película salivar e aos glucanos tratados são mostrados em A e B, respectivamente. Não houve diferença entre o controle veículo (V) e os extratos testados para ambas as análises. A porcentagem de UFC/mL foi obtida considerando o controle veículo (V) como 100%. Note-se que estes extratos promoveram adesão à matriz inicial de glucano. Os dados descritos são as medianas, representadas pelos traços e os intervalos interquartis, representados pelas caixas. As barras de erro indicam os valores máximos e mínimos. Os asteriscos denotam uma diferença estatisticamente significativa de um extrato específico *versus* controle de veículo (V), onde **** $p = 0,0001$ e ** $p \leq 0,0031$ (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn). O controle de crescimento é representado por Sm (*S. mutans*). As cores das barras do gráfico representam a variedade a que pertencem os extratos, sendo, a cor cinza escuro a var. *sylvestris*.
Fonte: Elaboração própria

5.6 Citotoxicidade de Extratos Seleccionados

Os dados de viabilidade celular (linhagem NOK-si) mostraram que a exposição dessas células durante 1 h aos extratos testados e ao controle veículo causa morte celular, em comparação com o controle de viabilidade (Figura 12). Porém, não houve diferença quando os extratos foram comparados com o controle veículo ($p > 0,9999$). Entretanto, ressalta-se que para uma formulação a ser utilizada na cavidade bucal, o tempo de exposição possivelmente será menor, bem como a mucosa bucal é um tecido com organização tridimensional e não células em monocamada.

Figura 12- Citotoxicidade dos extratos seleccionados



Os dados descritos são as medianas, representadas pelos traços e os intervalos interquartis, representados pelas caixas. As barras de erro indicam os valores máximos e mínimos. O “Cont V” indica controle de viabilidade celular e o “Cont M”, o controle de morte celular. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida considerando o controle de viabilidade celular como 100%. Os asteriscos denotam uma diferença estatisticamente significativa de um extrato específico *versus* controle de viabilidade celular (Cont M), onde **** $p < 0,0001$, *** $p = 0,0004$; ** $p = 0,0088$ e * $p \leq 0,0204$ (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn). As cores das barras do gráfico representam a variedade dos extratos, sendo, em cinza escuro: var. *sylvestris*; em cinza claro: var. intermediária; e em branco: var. *lingua*.

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que extratos e frações específicos de *C. sylvestris* exibem potentes efeitos antimicrobianos e antibiofilme contra dois dos principais microrganismos relacionados à patogênese da cárie dentária. Esta é a primeira triagem sistemática de *C. sylvestris* contra microrganismos cariogênicos e, a composição fitoquímica marcada pela presença de diterpenos do tipo clerodano e flavonoides glicosilados pode apresentar propriedades para controle de biofilme cariogênico e seu potencial deve ser explorado. Além disso, a origem natural desses extratos permite que sejam mais facilmente aceitos para o controle em longo prazo de doenças mediadas por biofilme, como a cárie, além ser menos dispendiosos ¹⁶⁷.

O modelo de biofilme monoespécies usado neste estudo tem sido recomendado para triagens iniciais de novos agentes anticárie ¹⁶⁸ e embora não imite a complexidade da microbiota das superfícies de esmalte/dentina, expressa uma virulência crítica característica do biofilme, a matriz polissacarídica ^{168, 169}. Vantagens importantes deste modelo incluem: a alta reprodutibilidade da formação de biofilme; permite triagem de alto rendimento de múltiplos compostos e concentrações em um único experimento ^{170,171} e; as etapas de tratamento podem ser consistentemente controladas ^{172, 173}.

Além disso, biofilmes utilizando um único microrganismo são vantajosos para a análise dos mecanismos de ação de agentes terapêuticos, especialmente nos processos mediados por glucanos envolvidos na formação da matriz polissacarídica no biofilme de *S. mutans* ¹⁶⁹ ou na formação de hifas, um fator de virulência muito importante de *C. albicans*, pois, torna o biofilme mais consistente e forma uma base adequada para a fixação de outros microrganismos, incluindo bactérias ¹⁶. Este fungo também foi escolhido para a triagem inicial de extratos, pois é um dos microrganismos frequentemente detectado em biofilmes (placa dentária) de crianças ⁶³ acometidas por cárie da infância e fornece um aumento de sítios de ligação para Gtfs derivados de *S. mutans* ⁶⁷.

Os resultados dos testes antimicrobianos e antibiofilme (biomassa e UFC/mL) indicam que extratos da var. *sylvestris* e bioma Mata Atlântica (FLO/SC, GUA/CE, PAC/CE e PRE/SP) efetuaram as reduções mais significativas para *S. mutans*. Ainda, PAC/CE e PRE/CE mostraram concomitante redução de *C. albicans* tanto em biofilmes - %UFC/mL (log₁₀) como em sua forma livre. Os efeitos inibitórios destes

extratos podem ser atribuídos à sua composição fitoquímica, a presença simultânea de flavonoides glicosilados e de diterpenos do tipo clerodano nestes extratos pode ser particularmente vantajosa, pois pertencem às classes de compostos eficazes contra fatores de virulência de microrganismos cariogênicos¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Além disso, os demais extratos testados contêm predominantemente compostos fenólicos e nenhum produziu efeitos inibitórios significativos. Assim, é provável que a atividade biológica dos extratos de *C. sylvestris* não poderia ser atribuída apenas a uma das classes de compostos, mas sim a um potencial sinergismo entre estas que promove efeitos contra diversos alvos. Ainda, é reconhecido que a terapia combinada entre terpenóides, como tt-farnesol, e flavonoides específicos (miricetina e apigenina) exibe bioatividade contra *S. mutans*, perturbando os mecanismos de virulência¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Embora não tenhamos identificado os componentes bioativos para cada extrato, um estudo fitoquímico anterior forneceu informações importantes sobre os componentes fenólicos a partir das folhas do extrato ARA/SP, seguindo o mesmo método de extração dos extratos testados aqui^{30, 148}. Catorze flavonoides glicosilados e uma catequina foram isolados e identificados, os compostos foram identificados da seguinte forma: (+) -catechin, quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (rutin), isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (isorhamnetin-3-O-neo-hesperidoside, isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (narcissin) e isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranoside¹⁴⁸. Outras análises fitoquímicas identificaram taninos (substância fenólica) em *C. sylvestris*^{177, 178} e um estudo prévio³⁰ com amostras ARA/SP, CAM/SP, MOG/SP e PRE/SP selecionou dois picos a partir dos cromatogramas e incluiu os diterpenos do tipo clerodano (casearinas), detectados a 235 nm³⁰. Outras investigações químicas isolaram 41 diterpenos de clerodano incluindo casearinas^{137, 142, 150, 155, 156, 179}, casearvestrins¹⁴³.

O foco deste estudo não foi isolar os compostos bioativos e identificar os potenciais alvos de ação dos extratos e frações analisadas, mas sim em realizar uma triagem sistemática para identificar quais possuem atividade biológica importante para controle/prevenção de biofilme cariogênico. No entanto, o conhecimento sobre quais compostos bioativos são encontrados em extratos e frações de *C. sylvestris* e seus possíveis mecanismos de ação auxilia na interpretação dos resultados e fornece bases para abordagens direcionadas, que devem ser mais amplamente exploradas em estudos futuros. Flavonoides podem se complexar com proteínas extracelulares

solúveis assim como com paredes celulares bacterianas ¹⁸⁰ e terpenóides pode promover ruptura das membranas pelas características lipofílicas ¹¹⁸. Estes efeitos podem estar relacionados com a redução >50% de UFC/mL (log₁₀) de *S. mutans* quando tratado pelos extratos. Mais investigações são necessárias para corroborar estes efeitos de *C. sylvestris*.

Os dados de %UFC/mL (log₁₀) após tratamento com as frações acetato de etila de ARA/SP, CAR/CE e SRM/MG mostram uma redução significativa da população de células viáveis de *S. mutans* >80%, em contraste com as demais frações. Apesar das frações acetato de etila serem fracionadas de extratos brutos com maior teor de flavonoides glicosilados, o método extrativo utilizado resulta em frações com maior teor de diterpenos em relação aos flavonoides, pois o acetato de etila é um ótimo solvente para extrair diterpenos clerodânicos (especificamente casearinas) devido a sua polariidade, assim, mesmo em extratos com pouco teor de diterpenos, o conteúdo que estiver presente, será extraído, variando apenas o rendimento entre cada fração resultante. A capacidade de terpenos atingirem as propriedades de virulência cariogênica é reconhecida e poderia ser responsável pelo efeito bactericida encontrado ^{174, 175}. Assim, devem agora ser consideradas para futuros estudos em relação à atividade contra biofilmes orais e na atividade de Gtfs, além da suma importância do isolamento e identificação de compostos bioativos das frações.

Entre os cartoze compostos fenólicos identificados em ARA/SP ³⁰, para dois deles (catequinas e quercetinas) foram descritos efeitos in vitro contra enzimas Gtfs de *S. mutans* ^{181,182} e na formação de glucanos solúveis e insolúveis em biofilmes dessa espécie ^{183, 184}. Além disso, quercetina tem atividade inibitória contra a produção de ácido bacteriano ^{185, 186}. Esta ação na atividade de Gtfs, descrita para os fenóis que também são encontrados em *C. sylvestris*, podem ser indiretamente responsáveis pela diminuição da biomassa observada nas análises antibiofilme para *S. mutans*, pois o efeito na atividade de Gtfs pode reduzir a quantidade de EPS e provocar a redução da biomassa do biofilme. Esta cascata de eventos limitaria os locais de ligação disponíveis para a adesão e a co-agregação bacteriana, interferindo na etapa inicial da formação do biofilme. Outro efeito na atividade de Gtfs seria a modificação de glucanos produzidos, em que o tipo de ligação glicosídica poderia ser afetado.

No presente estudo, FLO/SC, GUA/CE e PRE/SP afetaram a atividade de GtfB e diminuíram a quantidade de glucanos produzidos. Ainda, os FLO/SC, PAC/CE e PRE/SP podem ter afetado a qualidade dos glucanos formados por GtfB, pois um

maior número de células de *S. mutans* foram removidas após adesão aos glucanos quando esses extratos estavam presentes durante a síntese. Portanto, os quatro extratos poderiam modificar os glucanos formados na superfície de hidroxiapatita com película e essa modificação poderia enfraquecer a adesão de *S. mutans* à matriz inicial de glucanos. Este comportamento é desejável clinicamente, pois facilita a remoção mecânica das células quando do uso de formulação com estes extratos. Em contraste, esses quatro extratos não modificaram a película salivar, pois nenhum extrato promoveu aumento significativo da remoção de células aderidas à película.

Os diterpenos do tipo clerodano são metabólitos secundários da classe dos terpenos, essa classe de compostos foi identificada como responsável pela atividade sobre *C. albicans*. Terpenos atuam na permeabilidade de células fúngicas provocando mudanças nas propriedades das membranas e suas funções ¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ podendo desencadear mudanças na morfologia celular e inibir o crescimento deste fungo. Os taninos são descritos como um composto bioativo de *C. sylvestris* ^{177, 178} e alguns estudos demonstram sua capacidade em inibir in vitro o crescimento de levedura e atuação na membrana celular fúngica, através da precipitação de proteínas ¹⁹¹, portanto, taninos podem estar relacionados com os resultados obtidos após tratamentos de *C. albicans* com PAC/CE e PRE/SP. Além disso, embora RIO/RS e SRM/MG tenham apresentado redução estatisticamente significativa da população do biofilme de *C. albicans*, o quanto esta redução é biologicamente relevante, precisa ser investigada. Em RIO/RS e SRM/MG, quantificaram-se predominantemente flavonoides glicosilados, isto sugere que estes compostos atuem com maior eficácia quando em associação com os diterpenos, como em PAC/CE e PRE/SP, provavelmente devido a uma ação de algum componente (s) que aumenta a estabilidade ou biodisponibilidade do outro ou aumentando o seu metabolismo ¹⁹².

Particularmente, os extratos de *C. sylvestris* foram mais ativos contra *S. mutans* quando comparados aos efeitos contra *C. albicans*, tanto nas análises antimicrobianas como antibiofilme. Este fungo possui diversos fatores de virulência, como polimorfismo (influenciado por moléculas sensíveis ao *quorum sensing* - tirosol de levedura a hifa e tt- farnesol de hifa a levedura), formação de biofilme e controle da competição de nutrientes ^{193, 194}. Estes são os principais fatores associados à resistência e tolerância às drogas e podem causar efeito menos pronunciado dos extratos para este microrganismo. Ainda, de forma inesperada, a biomassa de *C. albicans* após os tratamentos apresentou alta variabilidade, este comportamento pode estar

relacionado tanto aos fatores intrínsecos do microrganismo como à variabilidade da atividade dentro do mesmo extrato ¹⁹⁵.

Embora os dados de viabilidade celular de queratinócitos indiquem morte celular após exposição de 1 h aos extratos testados, ressalta-se que para formulações de uso tópico na cavidade bucal, o tempo de exposição possivelmente será menor. Além disso, a metodologia do MTT tem suas limitações, a mucosa bucal é um tecido com organização tridimensional e não com células em monocamada e, portanto, estudos de toxicidade devem ser realizados utilizando modelos animais ou mesmo mais de um ensaio poderia ser usado para determinar a viabilidade celular em estudos *in vitro*, pois isso aumentaria a confiabilidade dos resultados obtidos ¹⁹⁶. Além disso, uma redução na citotoxicidade desses extratos pode ser alcançada isolando-se a fração ativa do extrato bruto, que deve ser melhor avaliada, e/ou diminuindo a concentração de EtOH e DMSO (com base no veículo).

É necessária prudência ao interpretar os dados apresentados para evitar a superavaliação dos efeitos para controle de biofilmes cariogênicos. O teor de flavonoides e diterpenos poderão ser padronizados nos extratos e frações promissores, superando problemas de variação composicional associados à extração fitoquímica e influências geográficas ou sazonais e futuramente ser utilizados em estudos usando modelos de biofilme polimicrobiano cultivado em superfície de esmalte/dentina. Cabe ressaltar que, quando em condições adequadas, *C. sylvestris* floresce e frutifica já no segundo ano de vida ¹³² e vive pelo menos 20 anos ¹³⁴, o que favoreceria seu cultivo para fins terapêuticos. Ainda, sua madeira pode ser usada como combustível e para construções diversas ¹³⁴. Assim, o cultivo controlado de *C. sylvestris* poderia contribuir para o desenvolvimento de novos agentes para controle de biofilme cariogênico a partir dos extratos brutos e frações, o que reduz o custo final quando comparado à compostos purificados.

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.

APÊNDICE A – Rendimento dos extratos brutos (peso em mg) e volumes de diluentes adicionados para diluir os extratos brutos de *C. sylvestris*. Ao adicionar esses volumes os estoques ficaram com 84,15% de etanol (EtOH) e 15% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Peso do extrato (mg)	Volume de Diluente (µL)	
	EtOH 99%	DMSO 100%
2,9	410,55	72,45
3	425	75
3,1	439,45	77,55
3,2	453,33	80

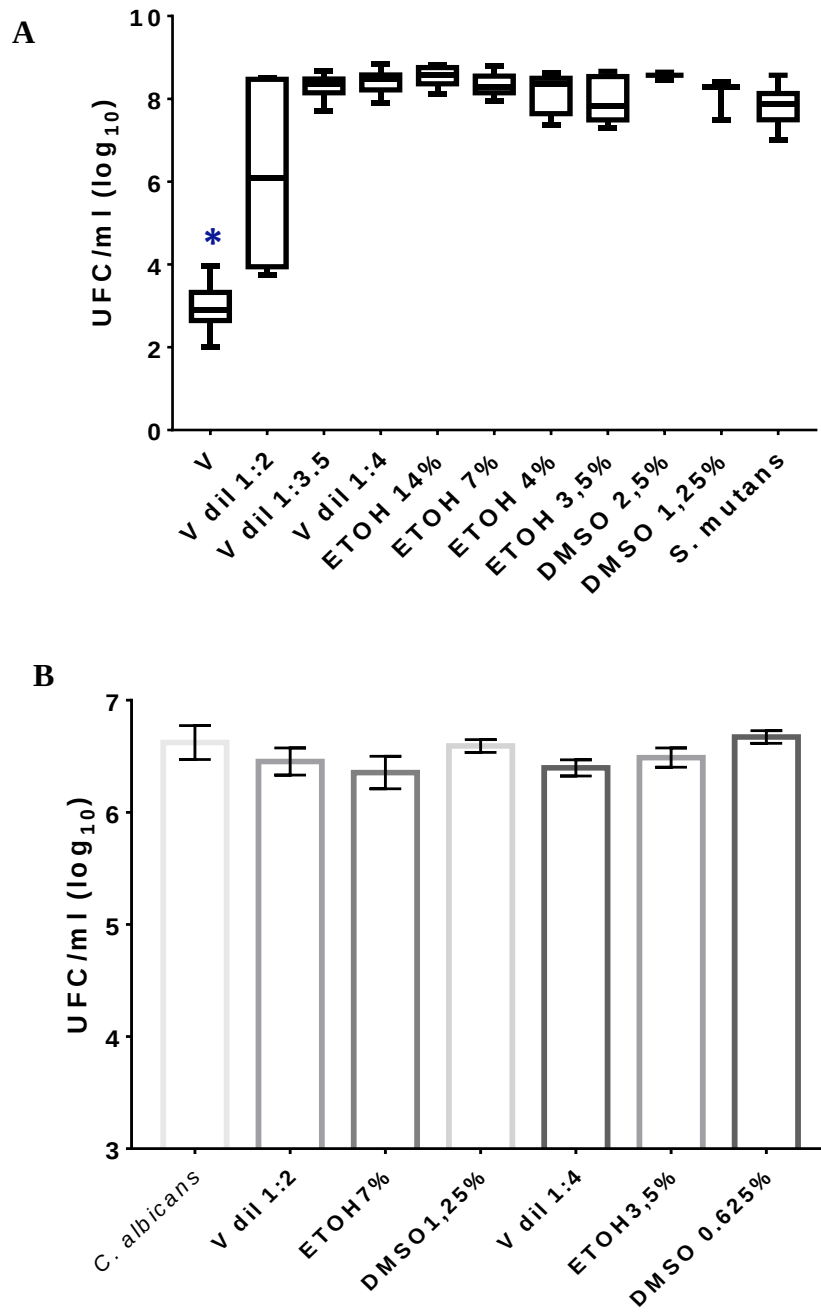
Fonte: Elaboração própria.

APÊNDICE B - Concentrações de EtOH e DMSO, sem adição dos extratos, para determinação de atividade antimicrobiana do veículo (V) para *S. mutans* UA159 e *C. albicans* SC5314.

Grupos	Volumes utilizados para tratamento dos poços
V (EtOH 14%+DMSO 2,5%)	33,33 µL de estoque veículo + 66, 67 µL de meio + 100 µL de mo
Vdil 1:2 (EtOH 7%+DMSO 1,25%)	16,67 µL estoque veículo + 83,33 µL de meio + 100 µL de mo
Vdil 1:3,5 (EtOH 4%+DMSO 0,7125%)	9,5 µL de estoque veículo + 83,33 µL de meio + 100 µL mo
Vdil1: 4 (EtOH 3,5 %+DMSO 0,625%)	8,33 µL de estoque veículo + 91,67 µL de meio + 100 µL mo
EtOH 14%	28,8 µL de EtOH 99% + 71,2 µL de meio+ 100 µL de mo
EtOH 7%	14,4 µL de EtOH 99% + 85,86 µL de meio + 100 µL mo
EtOH 4%	8,08 µL de EtOH 99% + 91,92 µL de meio + 100 µL mo
EtOH 3,5%	7,2 µL de EtOH 99% + 92,8 µL de meio+ 100 µL mo
DMSO 2,5%	5,05 µL de DMSO 100% + 94,95 µL de meio+ 100 µL mo
DMSO 1,25%	2,5 µL de DMSO 100% + 97,5 µL de meio+ 100 µL mo
Microrganismo (mo)	100 µL mo + 100 µL meio

Fonte: Elaboração própria.

APÊNDICE C – Gráfico gerado pelas análises do veículo (EtOH e DMSO) contra *S. mutans* UA159 (A) e *C. albicans* SC5314 (B) para testar extratos e frações.



Fonte: Elaboração própria.

APÊNDICE D – Rendimentos das frações (peso em mg) e volumes de diluentes adicionados para diluir as frações de *C. sylvestris*. Ao adicionar esses volumes os estoques ficaram com 28% de etanol (EtOH) e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Peso (mg)	Volume de Diluente (µL)		
	EtOH 99%	DMSO 100%	1x PBS, pH 7,4
0,25	70,75	12,5	166,75
0,3	84,9	15	200,1
0,33	93,39	16,5	220,11
0,37	104,71	18,5	246,79
0,40	113,2	20	266,81
0,43	121,69	21,5	286,81
0,47	133,01	23,5	313,49
0,5	141,5	25	333,5
0,6	169,8	30	400,2
0,7	198,1	35	466,9
1	283	50	667

Fonte: Elaboração própria.

ANEXO A

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

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

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

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

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 Medicinais. v.8, p.168 - 175, 2006.**

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**



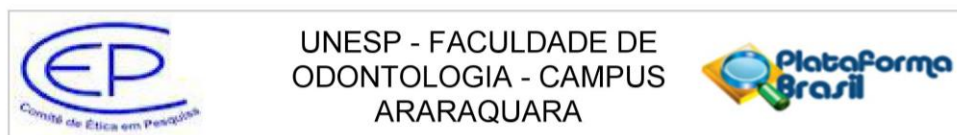
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:38** de **19/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO B

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: Avaliação de atividades antimicrobiana e anti-biofilme de extratos e frações de espécies vegetais sobre microrganismos patogênicos orais

Pesquisador: MARLISE INEZ KLEIN

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68161417.0.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.070.910

Apresentação do Projeto:

Projeto intitulado "Avaliação de atividades antimicrobiana e anti-biofilme de extratos e frações de espécies vegetais sobre microrganismos patogênicos orais". O estudo apresenta três etapas: 1- Avaliação do potencial antimicrobiano (antibacteriano e antifúngico) de extratos brutos e de frações espécies vegetais via determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/CFM); 2- Análise do potencial anti-biofilme dos extratos e de frações via método cristal violeta para determinação de biomassa e contagem de população microbiana dos biofilmes tratados; 3- Avaliação da capacidade dos extratos e de frações de inibir etapas iniciais na formação de biofilmes; especificamente, o efeito dos tratamentos na formação de glucanos na película salivar sobre superfície de hidroxiapatita e na adesão de microrganismos à película salivar e à matriz inicial (glucanos) sobre superfície de hidroxiapatita.

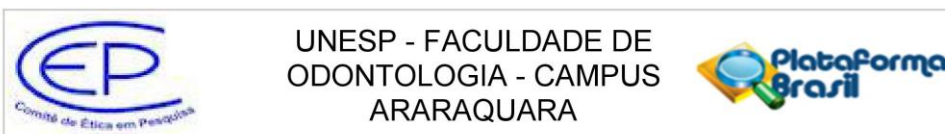
Objetivo da Pesquisa:

O objetivo é avaliar as atividades antimicrobianas e anti-biofilme in vitro de extratos vegetais e suas frações contra patógenos orais, em culturas planctônicas e biofilmes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não existem riscos sociais ou físicos significantes para a doação de saliva. O único risco é que o voluntário poderá engolir o pedaço de filme de parafina. Se isso acontecer, o filme se

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



Continuação do Parecer: 2.070.910

dissolverá no estômago do mesmo modo como uma goma de mascar se dissolve. Ainda, existe o inconveniente realizar doação mais de uma vez durante o período da pesquisa (2 anos). O voluntário pode se recusar e se retirar da pesquisa a qualquer momento, por qualquer razão.

Benefícios: O voluntário não se beneficiará por participar neste estudo. No entanto, os dados desse estudo permitirão alguns avanços científicos, e ajudarão no desenvolvimento de novas terapias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não foi citado o número de participantes no resumo. No arquivo "projetoapespsabrinamestrado.pdf", não foi descrito o volume de saliva que será coletado, o número de voluntários e a frequência que será realizada a coleta. Assim como a idade dos participantes e o gênero. Entretanto, essa informações está presentes no arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICA

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários foram enviados. O TCLE apresenta-se claro e objetivo, descrevendo todos os aspectos que julgo serem necessários.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 18 de Maio de 2017.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da 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_917687.pdf	10/05/2017 15:21:30		Aceito
Cronograma	Cronograma_Sabrina2017.pdf	10/05/2017 11:14:56	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_para_uso_de_clinica_para_coleta_de_saliva.pdf	10/05/2017 11:14:01	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_para_utilizacao_de_laboratorio.pdf	10/05/2017 11:13:47	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Previsao_de_ressarcimento_de_gastos.pdf	10/05/2017 11:13:32	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Ciencia.pdf	10/05/2017 11:13:12	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Declaração de	Termo_de_cumprimento_das_normas	10/05/2017	MARLISE INEZ	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

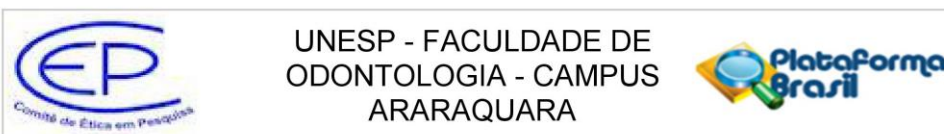
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.070.910

Pesquisadores	_do_CEP.pdf	11:12:51	MARLISE INEZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Sabrina_2017.pdf	10/05/2017 11:12:30	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_FINANCEIRO_Sabrina2017.pdf	10/05/2017 11:12:16	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofoar.unesp.br.pdf	10/05/2017 11:10:59	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_Plataforma_Brasil.pdf	10/05/2017 11:10:16	MARLISE INEZ KLEIN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 18 de Maio de 2017

Assinado por:

Ligia Antunes Pereira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 05 de Julho de 2021

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 05 de Julho de 2019.

Sabrina Marcela Ribeiro