

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/08/2023.



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



Jacqueline de Oliveira Zocolotti

Eficácia dos extratos de diferentes espécies de *Cryptocarya* (Lauraceae) sobre biofilme de *Candida albicans* e biocompatibilidade: estudos *in vitro* e *in vivo*

Araraquara

2021



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



Jacqueline de Oliveira Zocolotti

Eficácia dos extratos de diferentes espécies de *Cryptocarya* (Lauraceae) sobre biofilme de *Candida albicans* e biocompatibilidade: estudos *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral, Área de Prótese.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge
Co-orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2021

Z84e Zoccolotti, Jacqueline de Oliveira
Eficácia dos extratos de diferentes espécies de *Cryptocarya* (Lauraceae) sobre biofilme de *Candida albicans* e biocompatibilidade: estudos in vitro e in vivo / Jacqueline de Oliveira Zoccolotti. -- Araraquara, 2021
79 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Janaina Habib Jorge
Coorientador: Alberto José Cavalheiro

1. *Cryptocarya*. 2. *Candida albicans*. 3. Biofilmes. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Jacqueline de Oliveira Zocolotti

Eficácia dos extratos de diferentes espécies de *Cryptocarya* (Lauraceae) sobre biofilme de *Candida albicans* e biocompatibilidade: estudos *in vitro* e *in vivo*

Tese para obtenção do título de Doutora em Reabilitação Oral, Área de Prótese.

Comissão julgadora

Presidente e orientadora: Prof. Dra. Janaina Habib Jorge

2º Examinador: Prof. Dra. Ana Carolina Pero

3º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

4º Examinador: Prof. Dra. Paula Aboud Barbugli

5º Examinador: Prof. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

Araraquara, 06 de agosto de 2021

DADOS CURRICULARES

Jacqueline de Oliveira Zoccolotti

NASCIMENTO: 09 de Janeiro de 1989 – São Carlos – São Paulo

FILIAÇÃO: Roberto Sidnei Zoccolotti
Sílvia Maria de Oliveira Zoccolotti

2010/2014 Curso de Graduação na pela Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2013/2014 Estágio de iniciação Científica na Disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

2015/2017 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2015 Estágio de Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível I, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2016 Estágio de Docência na Disciplina de Prótese Parcial Removível II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2017/2021 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2018/019 Estágio de Docência na Disciplina de Prótese Fixa Convencional e sobre Implantes II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

AGRADECIMENTOS

À CAPES:

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

Zoccolotti JO. Eficácia dos extratos de diferentes espécies de *Cryptocarya* (Lauraceae) sobre biofilme de *Candida albicans* e biocompatibilidade: estudos in vitro e in vivo. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2021.

RESUMO

Candidíase é uma infecção oportunista da mucosa causada por espécies de *Candida*, sendo a *Candida albicans* o agente etiológico mais comum. O uso de terapias antifúngicas deve ser limitado por causa da sua toxicidade, das baixas taxas de efetividade, da indução de resistência fúngica e baixa solubilidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia dos extratos de diferentes espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* e sua biocompatibilidade por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. Em um primeiro estudo, os extratos foram avaliados em relação à Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em células planctônicas de *C. albicans* bem como a Concentração Fungicida Mínima dessas células em biofilme (CFMb). Tais análises foram realizadas por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Posteriormente, um biofilme maduro (48 horas) foi formado sobre amostras de resina acrílica para bases de próteses e os efeitos fungicidas dos extratos sobre esse biofilme também foram avaliados por meio dos testes *AlamarBlue*® e contagem das UFC/mL. Além disso, foi realizada a microscopia de varredura confocal a laser para análise qualitativa e quantitativa do biofilme após o tratamento proposto. Em um segundo estudo, a citotoxicidade de extratos das espécies do gênero *Cryptocarya*, que apresentaram os melhores resultados nos testes anteriores, foi avaliada por meio do teste *AlamarBlue*®, utilizando-se queratinócitos orais normais (NOK). Por fim, foi determinada a eficácia do extrato selecionado nos estudos *in vitro* na inativação de biofilme de *C. albicans* presente no dorso lingual de camundongos com candidose induzida. Para isso, após os tratamentos com a planta medicinal, os fungos presentes no dorso lingual de camundongos foram coletados e analisados por meio dos testes *AlamarBlue*® e UFC/mL. Foi realizada a análise histológica do tecido da língua do camundongo após os diferentes tratamentos. Para cada variável, os dados foram submetidos à análise estatística mais adequada, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que os extratos obtidos das folhas e frutos de *C. moschata* e *C. mandioccana* foram capazes de reduzir o número de unidades formadoras de colônias e o metabolismo celular do biofilme de *C. albicans* formado sobre amostras de resina acrílica para base de próteses, comprovando seu efeito antimicrobiano. Esses extratos também reduziram a viabilidade das células epiteliais quando avaliados por meio do teste *AlamarBlue*®. E no estudo *in vivo*, em que foi utilizado o extrato de folha de *C. moschata* observamos histologicamente que não houve dano celular na língua dos camundongos, e houve diminuição do biofilme de *Candida* semelhante ao uso de nistatina. Podemos concluir que o extrato foi eficaz contra o biofilme de *C. albicans* e foi biocompatível no estudo *in vivo*.

Palavras-chave: *Cryptocarya*. *Candida albicans*. Biofilmes.

Zoccolotti JO. Efficacy of extracts from different species of *Cryptocarya* (Lauraceae) on *Candida albicans* biofilm and biocompatibility: in vitro and in vivo studies. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2021.

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic mucosal infection caused by *Candida* species, *Candida albicans* being the most common etiological agent. The use of antifungal therapies should be limited because of their toxicity, low effectiveness rates, induction of fungal resistance, and low solubility. The present study aims to evaluate the efficiency of the extracts from different *Cryptocarya* species on *Candida albicans* biofilm and its biocompatibility by in vitro and in vivo studies. In a first study, the plants were evaluated in relation to the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of planktonic cells of *C. albicans* as well as the Minimum Fungicidal Concentration of these cells in biofilm (CFMb). These analyzes were carried out counting the number of colony-forming units (CFU/mL). Subsequently, a mature biofilm (48 hours) was formed on acrylic resin samples for denture bases and the fungicidal effects of the extracts on this biofilm were also evaluated. These analyzes were performed using AlamarBlue® tests and counting of CFU/mL. Moreover, confocal laser scanning microscopy was performed for qualitative and quantitative analysis of the biofilm after the proposed treatment. In a second study, the cytotoxicity of extracts from species of the *Cryptocarya* genus, which categories showed the best results in previous tests, was evaluated using the AlamarBlue® test, using normal oral keratinocytes (NOK). Finally, the efficiency of the selected extract in inactivating *C. albicans* biofilm presents on the dorsal lingual surface of mice with induced candidosis was determined. For this, after treatments with the medicinal plant, the fungi present on the dorsal lingual surface of mice were collected and analyzed using the AlamarBlue® and UFC/mL tests. Histological analysis of the mice epithelial tongue cells was performed after the different treatments. For each variable, the data were subjected to the most appropriate statistical analysis, with a significance level of 5%. The results showed that the extracts obtained from the leaves and fruits of *C. moschata* and *C. mandioccana* were able to reduce the number of colony-forming units and the cellular metabolism of the *C. albicans* biofilm formed on acrylic resin samples for denture base, proving its anti-microbial effect. These extracts also reduced the viability of epithelial cells when evaluated by the AlamarBlue® test. The in vivo study, in which *C. moschata* leaf extract was used, we observed that histologically there was no cell damage in the mice's tongue, and there was a decrease in *Candida* biofilm similar to the use of nystatin. It therefor has to be concluded that the extract was effective against *C. albicans* biofilm and was biocompatible in the in vivo study.

Keywords: *Cryptocarya*. *Candida albicans*. Biofilms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 PROPOSIÇÃO.....	16
2.1 Objetivos Específicos.....	16
2.1.1 Estudo I (<i>in vitro</i>)	16
2.1.2 Estudo II (<i>in vitro</i>)	16
2.1.3 Estudo III (<i>in vivo</i>)	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
4 MATERIAL E MÉTODO.....	24
4.1 Estudo I (<i>in vitro</i>).....	24
4.1.1 Coleta do material vegetal.....	24
4.1.2 Preparo do extrato vegetal.....	24
4.1.3 Microrganismos e condições de crescimento.....	25
4.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para as células planctônicas.....	26
4.1.5 Determinação da concentração fungicida mínima dos extratos em biofilme (CFMb):.....	26
4.1.6 Confeção dos corpos de prova.....	27
4.1.7 Medida da rugosidade superficial.....	28
4.1.8 Coleta da saliva.....	29
4.1.9 Formação do biofilme sobre as amostras.....	29

4.1.10 Atividade antifúngica dos extratos das espécies de <i>Cryptocarya</i>	30
4.1.11 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®.....	31
4.1.12 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL).....	31
4.1.13 Microscopia de varredura confocal a laser (MVCL).....	32
4.1.14 Desenho do estudo.....	32
4.1.15 Análise estatística.....	32
4.2 Estudo II (<i>in vitro</i>).....	33
4.2.1 Cultura e manutenção das células.....	33
4.2.2 Quantificação das células.....	34
4.2.3 Avaliação da proliferação celular por meio do teste AlamarBlue®.....	34
4.2.4 Desenho do estudo.....	35
4.2.5 Análise estatística.....	35
4.3 Estudo III (<i>in vivo</i>).....	36
4.3.1 <i>Candida albicans</i> e condições de crescimento.....	36
4.3.2 Animais.....	36
4.3.3 Indução de candidose em língua de camundongos.....	37
4.3.4 Tratamento (grupos experimentais).....	38
4.3.5 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL).....	40
4.3.6 Sacrifício dos animais e análise histológica.....	41
4.3.7 Desenho do estudo.....	42
4.3.8 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Estudo I (<i>in vitro</i>)	43

5.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para as células planctônicas.....	43
5.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima das células em biofilme (CFMb).....	43
5.1.3 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®.....	44
5.1.4 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL).....	45
5.1.5 Microscopia de varredura confocal a laser (MVCL).....	47
5.2 Estudo II (<i>in vitro</i>).....	49
5.3 Estudo III (<i>in vivo</i>).....	51
5.3.1 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL).....	51
5.3.2 Análise histopatológica da língua dos camundongos.....	52
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO A – PROTOCOLO CEP: CAAE 79249417.0.0000.5416.....	78
ANEXO B - PROTOCOLO CEUA: 36/2017.....	79

1 INTRODUÇÃO

Candidíase é uma infecção oportunista da mucosa causada por espécies de *Candida* (Belazi et al.¹ 2004; Dongari-Bagtzoglou et al.² 2009), sendo a *Candida albicans* o agente etiológico mais comum (Fidel et al.³ 1999). Um exemplo de infecção orofaríngea é a estomatite protética. A estomatite protética é a condição inflamatória eritematosa encontrada com maior frequência nos pacientes portadores de próteses removíveis parciais ou totais. Tal doença caracteriza-se por eritema difuso, que pode ter aspecto homogêneo, de pontos ou áreas focais avermelhadas, além de causar variadas alterações na textura e superfície da mucosa palatina. A etiologia da estomatite protética mostra-se extremamente variável, sendo considerada multifatorial. Infecção por *Candida* spp, trauma, gênero, tabaco, deficiências nutricionais, uso contínuo de prótese e xerostomia constituem fatores predominantes na etiologia desta alteração (Dorocka-Bobkowska et al.⁴ 1996; Feltrin et al.⁵ 1993; Webb et al.^{6,7} 1998; Calcaterra et al.⁸ 2013). Porém, é consenso na literatura que a infecção por *Candida* spp. é o fator mais predominante para o desenvolvimento da estomatite protética.

As espécies de *Candida* spp possuem a capacidade de se organizarem em estruturas denominadas biofilmes (Donlan et al.⁹ 2001; Hoyle et al.¹⁰ 1990). Clinicamente, esses aglomerados aderentes de células representam um sério obstáculo para o tratamento das infecções. Uma das características que distinguem as comunidades de biofilme é a sua capacidade em se aderir em determinadas superfícies, bióticas ou abióticas. Muitos tipos de dispositivos são propícios à formação do biofilme, incluindo cateteres, próteses, implantes e válvulas cardíacas artificiais (Kojic et al.¹¹ 2004). Neste aspecto, as superfícies de próteses removíveis parciais ou totais proporcionam um nicho ideal para formação de biofilme e, conseqüentemente, aumentam o risco das infecções como a estomatite protética.

Os tratamentos direcionados à estomatite protética são variados, podendo incluir terapia antifúngica tópica, medicação antifúngica sistêmica, cuidados com a higiene bucal, procedimentos de limpeza e desinfecção das próteses, substituição de próteses antigas, eliminação de irregularidades anatômicas, restabelecimento de oclusão e restituição nutricional (Budtz-Jørgensen¹² 1974; Budtz-Jørgensen¹³ 2000; Neppelenbroek et al.¹⁴ 2008). Além disso, estudos mostraram a influência do uso

noturno de próteses na prevalência de espécies de *Candida spp*, tendo-se concluído que para proteger e preservar a integridade do epitélio da mucosa, o paciente deve dormir sem as próteses (Compagnoni et al.¹⁵ 2007). A escolha de um tratamento ou a associação de mais de um deles é um aspecto a ser considerado individualmente.

Nos últimos anos, houve maior utilização de agentes antifúngicos, fato que resultou no desenvolvimento de espécies resistentes às drogas. Diferentes tipos de mecanismos contribuem para o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (Kathiravan et al.¹⁷ 2012). Atualmente, o uso de terapias antifúngicas deve ser limitado por causa da sua toxicidade, das baixas taxas de efetividade, da indução de resistência fúngica e baixa solubilidade (Kathiravan et al.¹⁷ 2012). Diante disso, muitas pesquisas atuais buscam terapias alternativas para o tratamento de infecções, sendo a fitoterapia uma alternativa viável para atingir este objetivo. A Organização Mundial de Saúde recomenda o uso de fitoterápicos como forma de reduzir os custos dos programas de saúde pública, provendo acesso mais fácil para a população mais pobre, em especial nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. O uso de plantas medicinais tem menor custo e já é utilizado a várias gerações, sendo que um grande número de pesquisas nesta área é ainda observado (da Rosa et al.¹⁸ 2011). Outra vantagem do uso das plantas medicinais é a baixa toxicidade, quando utilizadas corretamente. Mostra-se uma terapêutica promissora no campo farmacológico, pois apresenta como grande vantagem a escassez de efeitos colaterais, sendo, às vezes, relatada apenas uma pequena ardência na mucosa, quando comparada aos produtos sintéticos (Drumond et al. ¹⁹ 2004). Na odontologia, a fitoterapia já é usada com sucesso há vários anos. De acordo com a literatura, o cravo-da-índia, a camomila, a malva, a romã, a unha-de-gato e a própolis possuem ação consubstanciada por testes clínicos e laboratoriais e estão entre os fitoterápicos mais utilizados na Odontologia. Possuem ação antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, dentre outras (Aleluia et al.²⁰ 2015).

A família *Lauraceae*, distribuída em 52 gêneros com cerca de 3000 espécies, é predominantemente composta por árvores e arbustos. Cerca de 439 dessas espécies são encontradas no Brasil (Quinet et al. ²¹ 2015), compondo parte da Mata Atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica (Moraes ²² 2007). O gênero *Cryptocarya* é um dos maiores da família *Lauraceae* composto por cerca de 350 espécies, 13

destas presentes no Brasil, sendo que oito estão presentes na Mata Atlântica: *C. aschersoniana*, *C. granulata*, *C. jacarepaguenses*, *C. micrantha*, *C. mínima*, *C. moschata*, *C. saligna* e *C. mandioccana* (Moraes²³ 1997; Moraes²² 2007).

Várias espécies de *Cryptocarya* foram estudadas com foco em sua fitoquímica e farmacologia, contudo, levantamento realizado com as espécies presentes no Brasil indicou que existem estudos químicos de apenas quatro delas (*C. botelhensis*, *C. mandioccana*, *C. moschata* e *C. saligna*) e que as substâncias comumente encontradas no gênero são alcalóides, flavonóides e estilipironas (Cavalheiro e Yoshida²⁴ 2000; Nehme et al²⁵ 2008; Bandeira et al²⁶ 2009; Zonaro²⁷ 2016). Estudos com o extrato etanólico da polpa de frutos verdes e sementes de *C. moschata* demonstraram a existência de estilipironas, os quais apresentaram atividade antifúngica (Ricardo et al.²⁸ 2004). Estudos prévios observaram atividade antifúngica várias estilipironas obtidas a partir de folhas de *C. moschata* e *C. mandioccana* (Giocondo et al.³⁰ 2009; Telascrêa³¹ 2006). Ricardo et al.²⁸ (2004), a partir do extrato de hastes e raízes de *C. moschata*, isolaram três tipos de pironas. Um desses compostos foi identificado como 5,6-di-hidro-6-propil-2H-pirano-2-ona que, em ensaio de atividade antifúngica com fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, demonstrou atividade moderada e teve a sua CIM determinada comparada com compostos fungicidas padrões de nistatina e myconazol.

Apesar dos resultados promissores em relação a fitoquímica e farmacologia de várias espécies de *Cryptocarya*, nenhum estudo foi encontrado na literatura a respeito de seu efeito sobre biofilme de *Candida albicans* formados sobre amostras de resina acrílica utilizada na confecção de próteses removíveis. Sendo assim, e com o objetivo promover uma opção de baixo custo, acessível e não sintética para o tratamento de infecções fúngicas orais, tais como a estomatite protética, este projeto de pesquisa propôs avaliar (I) a eficácia de espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* formados em amostras de resina acrílica para base de próteses; (II) avaliar a citotoxicidade de espécies de *Cryptocarya* sobre queratinócitos orais normais e (III) avaliar a eficácia de espécies de *Cryptocarya* na inativação de biofilme de *Candida albicans* presente no dorso lingual de camundongos com candidose induzida. É importante ressaltar que nenhum estudo com os mesmos propósitos foi encontrado

na literatura. Assim, tais objetivos foram considerados importantes e necessários. Além disso, toda pesquisa em humanos deve estar fundamentada na experimentação prévia, realizada em laboratórios, utilizando-se animais ou outros modelos experimentais. Dessa forma, os resultados do presente estudo trarão informações relevantes que possibilitarão a realização de estudos clínicos futuros.

7 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os resultados obtidos e as limitações do presente estudo, pôde-se concluir que os extratos obtidos das folhas e frutos de *C. moschata* e *C. mandioccana* foram capazes de reduzir o número de unidades formadoras de colônias e o metabolismo celular do biofilme de *C. albicans* formado sobre amostras de resina acrílica para base de próteses, comprovando seu efeito antimicrobiano. Esses extratos também reduziram a viabilidade das células epiteliais (em monocamada). Porém, no estudo in vivo, em que foi utilizado o extrato de folha de *C. moschata*, observamos que histologicamente não houve dano celular na língua dos camundongos e houve diminuição do biofilme de *C. albicans*, semelhante ao grupo tratado com nistatina, usado como controle positivo.

REFERÊNCIAS*

1. Belazi M, Velegraki A, Velegraki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, et al. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19:347–51.
2. Dongari-Bagtzoglou A, Dwivedi P, Ioannidou E, Shaqman M, Hull D, Burleson J. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24:249–54.
3. Fidel PL Jr., Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12:80–96.
4. Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Pathol Med.* 1996; 25: 411-5
5. Feltrin PP, Tortamano N, Jaeger RG, Araújo VC. Estomatite protética: estudo da superfície interna da prótese total em microscopia eletrônica de varredura e da mucosa de suporte através de exame citológico, histopatológico e imunohistoquímico. *Rev Assoc Bras Odontol.* 1993; 1: 31-8.
6. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998; 43: 45-50.
7. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management : a review. Part.2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J.* 1998; 43: 160-6.
8. Calcaterra R, Pasquantonio G, Vitali LA, Nicoletti M, Di Girolamo M, Mirisola C, et al. Occurrence of *Candida* species colonization in a -population of denture-wearing immigrants. *Int J Immuno Pathol Pharmacol.* 2013; 26: 239-46.

* 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>

9. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:277–81.
10. Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother.* 1990; 26:1–5.
11. Kojic EM, Darouiche RO. Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:255–67.
12. Budtz-Jørgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974; 82: 151-90.
13. Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28: 141-9.
14. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of Candida-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35: 836-46.
15. Compagnoni MA, Souza RF, Marra J, Pero AC, Barbosa DB. Relationship between *Candida* and nocturnal denture wear: quantitative study. *J Oral Rehabil.* 2007;34(8):600-5.
16. Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 1993; 2: 17-22.
17. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorgan Med Chem.* 2012; 20: 5678-98
18. Da Rosa C, Câmara SG, Béria JU. Representations and use intention of phytoterapy in primary health care. *Cien Saude Colet.* 2011; 16: 311-8.
19. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2004; 4: 33-8.
20. Aleluia CM, Procópio VC, Oliveira MTG, Furtado PGS, Giovannini JFG, Mendonça SMS. Fitoterápicos na odontologia. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo.* 2015; 27(2): 126-34.

21. Quinet A, Baitello JB, Moraes PLR, de Assis L, Alves FM. Lauraceae in lista de espécies da flora do Brasil [internet]. Jardim botânico do Rio de Janeiro. 2015. [acesso 2021 set 29]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>.
22. Moraes PLR. Taxonomy of *Cryptocarya* species of Brazil. *Abc Taxa*. 2007; 3; 1-191.
23. Moraes PLR. Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Ness & Martius ex Ness (Lauraceae) [Tese de Doutorado]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, UNESP; 1997.
24. Cavalheiro AJ, Yoshida M. 6-[ω -arylalkenyl]-5,6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). *Phytochemistry*, 2000; 53: 811-9.
25. Nehme CJ, Moraes PLR, Tininis AG, Cavalheiro AJ. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). *Bioch Syst Ecol*. 2008. 36: 602-11.
26. Bandeira KF, Cavalheiro AJ. An LC–DAD fingerprinting method for alkaloids, flavonoids and styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. *Chromatographia*. 2009; 70:1455-60.
27. Zonaro VA. Análise de Estirilpironas de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-MS. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, UNESP; 2016.
28. Ricardo MAG, Andreco MA, Cavalheiro AJ, Castro-gamboa IC, Bolzani VS, Silva DHS. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. *Arkivoc*. 2004; 6:127-36.
29. Pascoli IC. Estudo fitoquímico dos frutos de *C. moschata* (Nees et Mart.) Mez. (Lauraceae) [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, UNESP; 2001.
30. Giocondo MP, Bassi CL, Telascree M, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Silva DHS, et al. Cryptomoschatone D2 from *Cryptocarya mandioccana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell lines. *Rev Ciênc Farm Básica*. 2009; 30: 315-22.
31. Telascree, M. Busca de substâncias antitumorais e antifúngicas através do estudo fitoquímico biomonitorado em *cryptocaryas mandioccana* e *C. moschata* (Lauraceae) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, UNESP; 2006.

32. Falcão AFP, Santos LB, Sampaio NM. Candidíase associada á prótese dentária. *Sitientibus*. 2004; 30: 135-46.
33. Simões RJ, Fonseca P, Figueira LMH. Oral infections by *Candida* spp. *Odontol Clín Cient*. 2013. 12(1): 19-22.
34. Scalercio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. *RGO (Porto Alegre)*.2007; 55(4): 395-8.
35. Beardsley J, Halliday CL, Chen SCA, Sorrell TC. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiol*. 2018; 13: 1175–91.
36. Ahmad Khan MS, Alshehrei F, Al-Ghamdi SB, Bamaga MA, Al-Thubiani AS, Alam MZ. Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. *Future Sci OA*. 2020; 6(2):FS0440.
37. Maciel AJ, Lacerda CP, Danielli LJ, Bordignon SAL, Fuentefria AM, Apel MA. Antichemotactic and antifungal action of the essential oils from *Cryptocarya aschersoniana*, *Schinus terebinthifolia*, and *Cinnamomum amoenum*. *Chem Biodivers*. 2019;16(8).
38. Araújo JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Santos Filho L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev Patol Trop*. 2004; 33: 55-64.
39. Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. In vitro evaluation of the anti-fungii activity of essential oils and plant extracts present in the amazon region about the strain of *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*. 2009; 38:184-91.
40. Dumontet V., Gaspard C, Van Hung N, Fahy J, Tchertanov L, SeÂvenet T, GueÂrittea F. New cytotoxic flavonoids from *Cryptocarya infectoria*. *Tetrahedron* 57. 2001; 6189-96.
41. Silva Teles MMR, Vieira Pinheiro A A, Da Silva Dias C, Fachine Tavares J, Barbosa Filho J M, Leitão Da Cunha EV. Alkaloids of the Lauraceae. *Alkaloids Chem Biol*. 2019;82:147-304.
42. Nehme CJ. Estudo da dinâmica circadiana e sazonal e da variabilidade populacional dos metabólitos secundários polares das folhas de *Cryptocarya moschata*

Nees (Lauraceae) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista,UNESP; 2001.

43. Bastos WL. Variabilidade química intraespecífica de *Cryptocarya aschersoniana* [Tese de Doutorado].Araraquara: Universidade Estadual Paulista,UNESP; 2003.

44. Feng R, Guo ZK, Yan CM, Li EG, Tan RX, Ge HM. Anti-inflammatory flavonoids from *Cryptocarya chingii*. *Phytochemistry*. 2012; 76:98-105.

45. Feng R, Wang T, Wei W, Tan RX, Ge HM. Cytotoxic constituents from *Cryptocarya maclurei*. *Phytochemistry*. 2013;90:147-53.

46. Chau DTM, Chung NT, Huong LT, Hung NH, Ogunwande IA, Dai DN, Setzer WN. Chemical compositions, mosquito larvicidal and antimicrobial activities of leaf essential oils of eleven species of Lauraceae from Vietnam. *Plants (Basel)*. 2020; 9: 606.

47. Huang W, Zhang WJ, Cheng YQ, Jiang R, Wei W, Chen CJ, et al. Cytotoxic and antimicrobial flavonoids from *Cryptocarya concinna*. *Planta Med*. 2014;80:925-30.

48. Andrade PM, Melo DC, Alcoba AET, Júnior WGF, Pagotti MC, Magalhães LG, et al. Chemical composition and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.). *An Acad Bras Ciênc*. 2018; 90:2671-8.

49. Panariello B, Alves F, Carmello JC. Padronização de curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028. In: Panariello B, Alves F, Carmello JC. Manual de protocolos do laboratório de microbiologia aplicada. Araraquara: Laboratório de microbiologia aplicada da Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014. p.19-20.

50. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. *Mycoses*. 2011; 54: 344-51.

51. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A110: methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard. 10th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. [acesso 2021 set 29]. Disponível em:

<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>.

52. Izumida FE, Jorge JH, Ribeiro RC, Pavarina AC, Moffa EB, Giampaolo ET. Surface roughness and *Candida albicans* biofilm formation on a reline resin after long-term chemical disinfection and toothbrushing. *J Prosthet Dent.* 2014; 112: 1523-9.
53. Pero AC, Barbosa DB, Marra J, Ruvolo-Filho AC, Compagnoni MA. Influence of microwave polymerization method and thickness on porosity of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008; 17: 125-9.
54. Panariello BH, Izumida FE, Moffa EB, Pavarina AC, Jorge JH, Giampaolo ET. Effect of mechanical toothbrushing combined with different denture cleansers in reducing the viability of a multispecies biofilm on acrylic resins. *Am J Dent.* 2016; 29(3):154-60.
55. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13: 136-40.
56. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004; 17: 340-4.
57. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14: 203-7.
58. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007; 24: 52-7.
59. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of time of storage in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009; 40: 93-100.
60. Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology.* 2012; 29:275-80.
61. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 321-6.

62. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 392-401.
63. Alves F. Estudo in vivo dos efeitos da terapia fotodinâmica, mediada pelo Photodithazine® e luz LED, sobre *Candida albicans* resistente a fluconazol [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, UNESP; 2013.
64. Carmello JC, Alves F, Ribeiro AP, G Basso F, de Souza Costa CA, Tedesco AC, et al. In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. *Oral Dis.* 2016 ; 22(5):415-22.
65. Nasrullah AA, Zahari A, Mohamad J, Awang K. Antiplasmodial alkaloids from the bark of *Cryptocarya nigra* (Lauraceae). *Molecules.* 2013;18: 8009-17.
66. Reddy DK, Shekhar V, Prabhakar P, Babu BC, Siddhardha B, Murthy USN, et al. Stereoselective synthesis and biological evaluation of (R)-rugulactone, (6R)-((4R)-hydroxy-6-phenyl-hex-2-enyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one and its 4S epimer. *Eur J Med Chem.* 2010; 45: 4657-63.
67. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 30-6.
68. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009; 47: 681-9.
69. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol.* 2010; 61: 534-40.
70. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242: 345-51.
71. Sumi MG, Mathai A, Reuben S, Sarada C, Radhakrishnan VV. Immunocytochemical method for early laboratory diagnosis of tuberculous meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 344-7.
72. Chang HS, Tang JY, Yen CY, Huang HW, Wu CY, Chung YA, et al. Antiproliferation of *Cryptocarya concinna*-derived cryptocaryone against oral cancer cells involving apoptosis, oxidative stress, and DNA damage. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16: 1-10.