



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



Jacqueline de Oliveira Zoccolotti

**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 Zoccolotti

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 <i>Cryptocarya</i> (Lauraceae) sobre biofilme de <i>Candida albicans</i> 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 Cavaleiro 1. <i>Cryptocarya</i>. 2. <i>Candida albicans</i>. 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 Zoccolotti

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

2016 Estagio 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 Estagio 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 Confecção 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.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de extratos de espécies do gênero *Cryptocarya* (Lauracea) sobre biofilme de *Candida albicans* e sua biocompatibilidade por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.1 Objetivos Específicos

2.1.1 Estudo I (*in vitro*)

Avaliar a eficácia de extratos das diferentes espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* formado em amostras de resina acrílica para base de próteses, selecionando os extratos com melhor atividade antifúngica para realização dos estudos II e III.

2.1.2 Estudo II (*in vitro*)

Avaliar a citotoxicidade dos extratos das espécies de *Cryptocarya* sobre queratinócitos orais normais por meio da utilização do teste *AlamarBlue*®.

2.1.3 Estudo III (*in vivo*)

Avaliar a eficácia do extrato de folha de *Cryptocarya. moschatta* na inativação de biofilme de *Candida albicans* presente no dorso lingual de camundongos com candidose induzida, bem como sua biocompatibilidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A candidíase é uma infecção fúngica causada pelo fungo *Candida* spp que pode afetar a pele, unhas, região genital e boca. Na odontologia, os casos de candidíase oral são muitos comuns, principalmente associados a próteses mal adaptadas ou com má higienização. Falcão et al.³², em 2004, relataram em uma revisão de literatura, que na candidíase oral associada a próteses dentárias, a espécie *Candida albicans* é uma das leveduras causadoras da infecção, podendo estar associada com outras espécies, como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. krusei*, e sendo muitas vezes a manifestação clínica como uma área eritematosa sob a prótese. Em 2013, Simões et al.³³, mostraram que a infecção por *C. albicans* é uma das causas mais frequentes de candidose relacionadas à cavidade oral. Além disso, os autores reportaram algumas lesões associadas à *Candida* spp como: estomatite protética, glossite romboide mediana (GRM) e queilite angular (QA). Em uma revisão de literatura (Scalercio et al.³⁴, 2007), relataram que *C. albicans* é um fungo dimórfico, que pode apresentar-se na forma de levedura (inócua) ou de hifa (patogênica), sendo esta última presente em pacientes que utilizam prótese total, imunodeprimidos, que estão sob antibioticoterapia ou que apresentam xerostomia induzida por medicamentos. Esse fungo possui a capacidade de aderir à prótese (acrílico) e fatores do hospedeiro podem influenciar nessa adesão, como: saliva, pH e bactérias presentes na boca.

A incidência de infecções fúngicas graves está aumentando rapidamente e, no entanto, a taxa de novas drogas disponíveis para tratá-las é lenta. O arsenal terapêutico limitado é um desafio para os médicos, porque os medicamentos disponíveis costumam ser tóxicos, caros, difíceis de administrar, ineficazes ou uma combinação dos quatro. Diante desse cenário, o surgimento de resistência é especialmente preocupante (Beardsley et al.³⁵ 2018). Os fármacos usados para infecções fúngicas invasivas são categorizados como polenos, azóis e equinocandinas. O surgimento de cepas resistentes a esses medicamentos e a toxicidade, indicam a necessidade de uma busca contínua por novos antifúngicos. Em um flagrante contraste com drogas antibacterianas, os armamentos existentes de drogas antifúngicas são extremamente diminutos. Além disso, os avanços nos programas de descoberta de

medicamentos antifúngicos são mais lentos que os da descoberta de medicamentos antibacterianos. Os antifúngicos atualmente disponíveis possibilitam o crescimento de fungos, impondo um nível mais alto de pressão seletiva, o que resulta no surgimento de cepas resistentes. Além disso, as células hospedeiras e os fungos são eucarióticos e, portanto, compartilham processos fisiológicos comuns. Essa também é uma das principais razões para a perceptível toxicidade no hospedeiro de alguns dos antifúngicos existentes (Ahmad Khan et al.³⁶ 2020).

A resistência microbiana ao tratamento convencional com antifúngicos foi relatada como um fator alarmante. Para agravar esse problema, o arsenal terapêutico disponível é limitado e os agentes antifúngicos comerciais podem apresentar efeitos adversos graves, como toxicidade renal e hepática. Novos compostos antifúngicos, ou mesmo substâncias capazes de interagir sinergicamente com os medicamentos já existentes no mercado, são urgentemente necessários para complementar a terapia convencional. A possibilidade de quimiossensibilização de patógenos por meio de compostos naturais tem se mostrado promissora no sentido de aumentar a eficácia da terapia convencional. Sabe-se que os metabólitos secundários produzidos por plantas também podem atuar como agentes antifúngicos. Essas substâncias podem auxiliar na cicatrização de feridas e diminuir os sintomas em pacientes afetados por dermatofitose. Nesse contexto, a pesquisa de novos compostos com potencial antifúngico é necessária, sendo os de origem natural uma opção que tem sido aceita e solidificada na comunidade científica devido às suas propriedades e eficácia comprovadas (Maciel et al.³⁷ 2019).

Em 2004, Araújo et al.³⁸ realizaram um estudo que avaliou a ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas, e o interessante foi a atividade antifúngica contra *C. albicans* de alguns compostos. De forma geral, as bactérias se mostraram mais resistentes do que os fungos aos óleos essenciais. O óleo essencial de *C. bonariensis* provocou sensibilidade nos fungos do gênero *Candida* spp (com exceção da *Candida krusei*). O óleo essencial de espécies de plantas do gênero *Lippia*, que possui como constituintes químicos carvona, mirceno, cariofileno e limoneno, também apresentou significativa atividade antifúngica contra *C. albicans*, assim como o óleo de *E. citriodora* e *E. iniflora* que inibiram o fungo. O trabalho ressalta a importância do

estudo de produtos naturais com ações antimicrobianas, principalmente óleos essenciais, para o controle de infecções.

Um estudo realizou a avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região Amazônica sobre cepas de *C. albicans* (Menezes et al.³⁹ 2009). Em relação aos extratos testados, o de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) apresentou boa atividade antifúngica, os de *Psidium guajava* (goiabeira) e de *Eleutheria plicata* (marupazinho) mostraram atividade antifúngica moderada e os outros extratos testados (*Annona glabra*, *Azadiractha indica*, *Bryophyllum calycinum* e *Mammea americana*) não demonstraram atividade antifúngica contra *C. albicans*. Algo interessante a ressaltar é que o principal componente ativo do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) é o eugenol, muito usado na odontologia, o qual estudos *in vitro* demonstraram que possui baixa citotoxicidade e potente atividade contra *C. albicans*.

A família Lauraceae apresenta vários gêneros e cerca de 3000 espécies espalhadas em todos os continentes, especialmente na Ásia e na América do Sul. A família Lauraceae é rica em alcalóides derivados do benziltetrahydroisoquinolínico (BTIQ) e este é o principal metabólito biossintetizado da família. Este metabólito pertence à via do ácido chiquímico e se origina de o aminoácido L-tirosina¹². O ácido chiquímico fornece uma rota alternativa para os compostos aromáticos, particularmente para aminoácidos aromáticos, tais como L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano. Este caminho é usado por micro-organismos e plantas. Foi observado que a origem biossintética dos alcalóides da Lauraceae não pode ser acomodada em apenas uma rota metabólica e pode resultar da combinação de derivados de um ou mais metabólitos distintos, como anabasina, parte do ácido nicotínico e parte da L-lisina, foebgrandinas A e B, proaporfina e dímeros de alcalóides indólicos, e diversos outros.

O gênero *Cryptocarya* pertence à família pantropical da Lauraceae, da qual várias espécies crescem nas florestas tropicais dos países da orla do Pacífico. Diferentes tipos de produtos naturais, apresentando considerável diversidade estrutural, têm sido isolados de espécies desse gênero, incluindo flavonóides e pironas (Dumontet et al.⁴⁰ 2001). A *Cryptocarya*, é um dos gêneros que mais produz os alcalóides (Silva Telles et al.⁴¹ 2018). *Cryptocarya mandioccana* (noz-moscada-do-brasil) é uma espécie de árvore de até 30 m de altura que é amplamente distribuída ao

longo da mata atlântica costeira do sul do Brasil. Seus frutos são distintos devido ao seu aroma e sabor pungente, sendo curativo e com propriedades estomacais. Sua casca, amarga e cheirosa, também é usada medicinalmente contra cólicas e diarreia. O chá feito de suas sementes é usado contra dores e suas folhas esmagadas, contra fortes cólicas. Ainda, como frutas são amplamente consumidas por populações de primatas (Moraes²² 2007). Nehme et al.⁴² (2001) identificaram como principais constituintes de extratos das folhas de *C. mandioccana* o flavonóide quercetina-3-O-ramnopiranosídeo e as estilpironas criptomoscatoína D2 e criptofoliona. Com novas análises, ainda das folhas, isolaram os flavonóides glicosilados quercetina-3-O-galactopiranosídeo, quercetina-3-O-glicopiranosídeo, quercetina-3-O-xilopiranosídeo, quercetina-3-O-arabinopiranosídeo e quercetina-3-O-alopiranosídeo, além das estilpironas criptomoscatoína E3, criptomoscatoína D1, criptomoscatoína D2, criptomoscatoína F1, desacetilcriptocarilactona, criptomoscatoína E1, criptofaliona e goniotalamina.

Espécie arbórea que atinge até 35 metros, a *C. moschata* apresenta diversos nomes populares, como canela-batalha, louro-precioso e canela-de-papagaio. A espécie é encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, São Paulo. O extrato bruto de suas folhas e caules apresentaram atividade antiproliferativa. A espécie também é indicada para plantios mistos em recuperação de áreas degradadas e na recuperação das margens de reservatórios de hidrelétricas (Moraes²², 2007). Das folhas de *C. moschata*, Bastos⁴³ (2003) isolou seis flavonóides e duas estilpironas: quercetina-3-O-ramnopiranosídeo, quercetina-3-Ogalactopiranosídeo, quercetina-3-O-glicopiranosídeo, quercetina-3-Oxilopiranosídeo, quercetina-3-O-arabinofuranosídeo, quercetina-3-O-6"-acetilalopiranosídeo, goniotalamina e 4'-hidroxi-6'-fenil-1',5'-hexadienil-5,6-diidro-2-pirona (Bastos⁴³, 2003). Estudos fitoquímicos da casca de *C. moschata* mostraram que as estilpironas são os metabólitos secundários típicos presentes nesta espécie (Cavalheiro e Yoshida²⁴, 2000). Glicosídeos flavonóides, bem como estilpironas, foram detectados em folhas, e a variabilidade intraespecífica qualitativa e quantitativa desses metabólitos secundários também foi determinada (Nehme et al.⁴², 2001). Outro estudo com as folhas de *C. moschata* levou ao isolamento de substâncias que apresentaram atividade contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladoporioides* e

C. sphaerospermum, além disso, nos testes de atividade antiproliferativa (in vitro) em linhagens celulares cancerígenas, a planta apresentou atividades contra as linhagens PC3 (próstata), MCF-7 (mama), HT-29 (cólon), UACC-62 (melanoma) e 786-0 (renal) (Telascrêa ³¹, 2006).

Em 2012, Feng et al.⁴⁴ realizaram uma investigação fitoquímica guiada por bioensaio sobre flavonoides anti-inflamatórios de *Cryptocarya chingii*, o que levou ao isolamento de algumas substâncias. Destas, foram relatados seis novos flavonoides (cryptogiona A-F), que antes não foram notificados, e nove compostos conhecidos ((2S)-5,7-dihidroxi-flavanona; cryptocaryanona B; cryptocaryona; desmetilinflectocaryona; cryptocaryona A; bicaryanona A,C e D; e chalcocaryanona C). Para avaliar a ação anti-inflamatória, foi investigada a atividade contra degradação de I κ B α induzida por TNF- α , que é um pré-requisito para a ativação da via NF- κ B. Os compostos (2S)-5,7-dihidroxi-flavanona, cryptocaryanona B e cryptocaryona demonstraram atividade contra a indução de resposta inflamatória por TNF- α , por bloquear a degradação de I κ B α .

Em outra pesquisa que relata sobre os constituintes citotóxicos da *Cryptocarya maclurei* (Feng et al. ⁴⁵, 2013), cinco novas flavononas (cryptogionas G-K) e um novo policetídeo (cryptomaclurona) foram isolados de um extrato orgânico feito do caule de *C. maclurei*. Os pesquisadores relataram um pouco sobre a estrutura química desses compostos e avaliaram a citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas como: KB (carcinoma nasofaríngeo humano), SGC-7901 (câncer gástrico) e SW1116 (câncer de cólon). Sobre a estrutura química, foi descrito que as cryptogionas G-K são exemplos raros de flavonoides de 17 carbonos, que possuem unidade adicional de dois carbonos em C-5, o que só foram encontrados no gênero *Cryptocarya*, e o novo policetídeo possuía um esqueleto com 16 carbonos. Foi observado que essa unidade adicional de dois carbonos em C-5 (ácido 5-acético/grupo lactona) nos flavonoides da *Cryptocarya*, pode ser um marcador quimiotaxonômico do gênero. No estudo foi relatada uma citotoxicidade moderada do composto cryptomaclurona.

Chau et al. ⁴⁶ (2020), testou vários óleos essenciais das folhas das Lauraceae quanto à atividade antimicrobiana e todos os óleos essenciais testados mostraram boas atividades antibacterianas contra os organismos Gram-positivos. Os

óleos essenciais de folhas de *L. viridis* e *N. ellipsoidea* demonstraram atividades particularmente notáveis contra *E. faecalis* e *B. cereus*, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 16 µg, enquanto o óleo essencial de folha de *C. impressa* mostrou excelente atividade anticandida com CIM de 16 µg/mL. Os componentes responsáveis pela atividade anticandida do óleo essencial de folhas de *C. impressa* não foram precisamente identificados. Nem o (*E*)-*carofileno* ou o *α*-*humuleno* demonstraram forte atividade anticandida *albicans*. A atividade anticandida do próprio biciclogermacreno aparentemente não foi determinada. No entanto, o Dodecanal, mostrou atividade contra *C. albicans* com uma CIM de 125 µg / mL.

Em um estudo sobre a citotoxicidade de flavonoides antimicrobianos de *Cryptocarya concinna* (Huang et al. ⁴⁷ 2014), foram isolados do caule extratos onde foram encontrados 5 novos flavonoides (cryptocononas A-E), junto com 6 compostos conhecidos (cryptoquiona A, cryptogiona C, cryptocaryanona A, cryptocaryona, kurzicalcolactona A e kurzilcalcolactona B) que foram determinados através da comparação com dados fornecidos pela literatura. Os compostos foram testados tanto com relação à sua atividade citotóxica, quanto antimicrobiana. Para avaliar a citotoxicidade, estes compostos foram testados contra linhagens celulares como: HT-29 (carcinoma colo retal humano), HCT-116 (câncer de cólon), SW480 (câncer de cólon) e MDA-MB-231 (câncer de mama). Os resultados exibiram atividade citotóxica moderada dos compostos cryptocaryona e kurzicalcolactona A, enquanto os outros foram inativos. Já em relação à atividade antimicrobiana, os compostos testados quanto à ação antibacteriana foram: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, e *Erwinia amylovora* e antifúngica foram: *Phytophthora capsici*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria solani*, e *Botrytis cinérea*. O resultado observado foi que apenas os compostos cryptocaryanona A, kurzicalcolactona A e kurzilcalcolactona B apresentaram uma atividade antimicrobiana significativa.

Em 2018, Andrade et al. ⁴⁸ avaliaram a composição química e as propriedades biológicas do óleo essencial das folhas de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. De acordo com o trabalho, a composição química predominante é de “uma mistura de monoterpenos e sequiterpenos, cujos componentes majoritários encontrados foram: limoneno (42,3%), linalol (9,7%) e nerodidol (8,6%). Foram

avaliados os efeitos anticariogênico, antimicobacteriano, leishmanicida e citotóxico in vitro. Para determinação da atividade antibacteriana e antimicobacteriana, foram utilizadas as seguintes bactérias: *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*, e o resultado foi que o óleo possui moderada eficácia contra bactérias cariogênicas, tuberculosas e não tuberculosas. No caso da citotoxicidade contra os macrófagos peritoneais que foram utilizados para o teste, o óleo apresentou-se altamente citotóxico após 24 horas de incubação. A atividade leishmanicida foi altamente ativa, assim como já foi descrito na literatura. Os autores ressaltam o fato de que as propriedades biológicas se dão pelo óleo possuir constituintes que não têm alvos celulares específicos, porém o caráter apolar dos óleos essenciais permite que eles atravessem facilmente as paredes celulares e membranas citoplasmáticas, portanto podem causar danos celulares como morte por necrose e apoptose.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estudo I (*in vitro*)

Avaliar a eficácia de diferentes espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* formados em amostras de resina acrílica para base de próteses.

4.1.1 Coleta do material vegetal

Na região sudeste do Brasil, mais especificamente na região de Mata Atlântica, são encontradas sete espécies de *Cryptocarya*. O estudo proposto se concentrou na avaliação dos extratos e substâncias presentes em espécies já estudadas pelo Prof. Alberto J. Cavaleiro e colaboradores, principalmente *Cryptocarya mandioccana*, *C. moschata* e *C. ashersoniana*. O Dr. Cavaleiro se dedica ao estudo químico desse gênero desde 2000 (Cavaleiro e Yoshida ²⁴ 2000). A coleta de *C. mandioccana* e *C. Saligna* foi realizada no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, Ubatuba - SP. *C. moschata* foi coletada na mata do Viveiro Camará, município de Ibaté - SP. Os locais de coleta foram selecionados pelo Dr. Cavaleiro por meio de estudos químicos anteriores, como já mencionado. Nesses estudos verificou-se variabilidade química intra-específica, de forma que escolhemos alguns espécimes cujos dados químicos e atividade antifúngica nos pareceram mais promissores para a atividade biológica a ser avaliada (Nehme ⁴² 2001, Nehme et al. ²⁵ 2008).

De cada espécie vegetal foi coletado de 0,5 a 1,0 kg de folhas, casca, tronco e frutos. As amostras coletadas foram secas em estufa com ventilação e renovação de ar, por 48 horas, na temperatura de 40 °C. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas (Bandeira et al. ²⁶ 2009).

4.1.2 Preparo do extrato vegetal

Os extratos vegetais foram preparados por sonicação (UAE – extração assistida por ultrassom) do material vegetal com solvente hidroalcoólico (água e

etanol). Foram realizadas três extrações com o solvente, por sonicação, durante 20 minutos cada, de forma a obter-se extratos de folhas, tronco, casca e fruto de cada espécie, utilizando proporção 1:10 (wt v-1) de matéria-prima: solvente. Depois, o extrato foi filtrado e concentrado com eliminação do solvente por liofilização. Os extratos brutos foram pesados e aliquotados para posteriormente serem diluídos em água com etanol nas proporções de interesse (Bandeira et al. ²⁶ 2009, modificado).

4.1.3 Microrganismos e condições de crescimento

Para realização dos experimentos foi realizada a reativação do micro-organismo *Candida albicans* (ATCC 90028). A reativação dos micro-organismos foi feita por meio da técnica de Placa com Semeadura Direta. Primeiramente, o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (SDA) foi retirado da geladeira e permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos. O tubo com o meio de cultura de micro-organismos foi removido do freezer, aberto assepticamente em chama do bico Bunsen. Em seguida, com uma alça esterilizada, foi retirada uma alíquota da cultura, a qual foi semeada (por estrias) em uma placa com meio de cultura sólido (SDA), usando o método de esgotamento por quadrante. Posteriormente, a placa foi incubada por 48 horas à 37°C. Após o crescimento das colônias foi realizado o pré-inóculo. Primeiramente, de maneira asséptica, em tubos tipo Falcon foram adicionados 10mL do meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) específico para crescimento da cepa. Em seguida, com uma alça de inoculação, 5 colônias, selecionadas aleatoriamente na placa, foram coletadas. O tubo foi levado ao aparelho Vortex e incubado na estufa a 37°C por 16 horas. Um tubo Falcon com 9,5mL do meio de cultura YNB foi utilizado para realizar a diluição na razão de 1:20 do pré-inóculo (ou seja, 9,5mL de meio de cultura líquido estéril + 0,5mL do pré-inóculo). Então, o tubo foi novamente vortexado. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, com filtro de 540nm, e o inóculo foi incubado por mais 8 horas na estufa a 37°C. Após essas 8 horas, o tubo Falcon foi removido da estufa e nova leitura em espectrofotômetro foi realizada para averiguar se houve crescimento dos micro-organismos até a fase de mid-log (Panariello et al. ⁴⁹ 2014). Confirmado o crescimento dos micro-organismos, o tubo foi levado a

centrifuga por 5 minutos para formação do “pellet”. Em seguida, o “pellet” foi lavado com PBS (phosphate-buffered saline) duas vezes. Após as duas lavagens, os micro-organismos foram ressuspensos em meio RPMI-1640. Posteriormente, a densidade óptica da suspensão foi medida e normalizada para uma concentração de 1×10^6 células/mL (Zamperini et al. ⁵⁰ 2011).

4.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para as células planctônicas

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em placas de cultura de 96 poços, de acordo com o protocolo recomendado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI ⁵¹). Os valores foram determinados pela incubação estática das suspensões do micro-organismo, por 24 horas à 37°C, expostos às diferentes concentrações da planta medicinal avaliada neste estudo (espécies de *Cryptocarya* a 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%). Após 24 horas de contato, o valor da CIM foi dado pela menor concentração do extrato em mg/mL-1, capaz de impedir o crescimento microbiano, observado pela turvação visual ou não do meio de cultura. A seguir, uma alíquota de cada orifício da placa foi diluída em PBS até 10^{-4} , plaqueada, colocada em estufa por 48 horas e contada para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) por meio da contagem do número de colônias viáveis, sendo o valor da CFM determinado como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. As análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas.

4.1.5 Determinação da concentração fungicida mínima dos extratos em biofilme (CFMb):

Para a formação do biofilme, primeiramente, 100 µL do meio de cultura, contendo as células fúngicas na concentração de 1×10^6 células/mL, complementado com 100 µL de meio RPMI-1640 tamponado, com MOPS (Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico) e pH 7,0, foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 orifícios. Em seguida, a placa foi levada para incubação a 37 °C, em agitador orbital (75 rpm)

durante 90 minutos (adesão inicial). Posteriormente, as células não aderidas foram removidas da placa por meio de lavagem com tampão PBS estéril, por duas vezes, e 200 µL de meio de cultura RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH de 7,0) foram colocados em cada poço da placa para formação do biofilme. A placa foi levada para incubação durante 24 horas a 37 °C sob agitação orbital (75 rpm). Após as 24 horas, 100 µL de meio foram retirados dos poços e o mesmo volume novo de meio RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) foi adicionado. A placa foi, então, incubada novamente durante mais 24 horas, totalizando 48 horas de formação de um biofilme maduro. Após 48 horas, o meio foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por lavagem dos biofilmes duas vezes com tampão PBS estéril. Após a formação do biofilme, foi adicionado a cada orifício da placa 200 µL das soluções de extratos de *Cryptocarya sp* em diferentes concentrações, partindo da concentração do CIM para células plânctônicas e aumentando a cada orifício gradativamente em 5x, 10x, 15x, até a concentração máxima possível (100%). Essas soluções foram mantidas em contato com o biofilme por um período de 24 horas à 37 °C. Após o período de incubação, a CFMb foi determinada como sendo a menor concentração capaz de inibir o crescimento do biofilme, que foi observado pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias. As análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas.

4.1.6 Confeção dos corpos de prova

Com o objetivo de verificar a atividade antifúngica dos extratos de *Cryptocarya sp* sobre uma resina acrílica para base protética, polimerizada por energia de micro-ondas (Vipi Wave; VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil), material usado para confecção de próteses, corpos de prova foram confeccionados e biofilme maduro (48 horas) de *Candida albicans* foi formado sobre os mesmos.

Primeiramente, matrizes metálicas, contendo orifícios medindo 14 mm de diâmetro x 1,2 mm de espessura, foram colocadas em mufla própria para micro-ondas, entre duas placas de vidro. Essas placas foram previamente jateadas com óxido de

alumínio para padronizar a rugosidade da superfície das amostras em aproximadamente 3,0 μm (Izumida et al. ⁵² 2014), simulando a superfície interna das próteses. Posteriormente, a resina acrílica para base de próteses foi manipulada de acordo com as instruções do fabricante em uma proporção de 14,6 g de pó com 6,5 mL de líquido, e a matriz foi, então, preenchida com a resina acrílica na fase plástica. A prensagem da resina acrílica foi realizada aplicando-se cargas graduais de 0,5, 0,8 e 1,25 tonelada-força (tnf). Nessa última carga, a mufla foi mantida sob a prensa por cerca de 30 minutos e fechada com auxílio de parafusos próprios (Pero et al. ⁵³ 2008). Em seguida, os corpos de prova foram polimerizados em um forno de micro-ondas doméstico 500W (Brastemp da Amazônia SA, Manaus, AM, Brasil) por 20 minutos com potência de 20%, seguido por 5 minutos com potência de 80% (de acordo com as recomendações do fabricante da resina). As muflas foram colocadas em bancada durante a noite para o resfriamento. Após a demuflagem, os excessos das amostras foram removidos com uma ponta Maxi-Cut (Lesfils de August Malleifer SA, Ballaigues, Suíça). Após a remoção dos excessos, todos os corpos de prova foram lavados em banho de ultrassom utilizando água destilada durante 15 minutos para remover os resíduos decorrentes do processo de confecção das amostras e armazenados em água destilada em estufa por 48 horas para eliminação do monômero residual.

4.1.7 Medida da rugosidade superficial

Após a obtenção dos corpos de prova, a rugosidade superficial foi mensurada com o intuito de padronizar as amostras e homogeneizar os grupos. A precisão de leitura do rugosímetro foi de 0,01 μm (Mytutoyo Corporation, Tokyo, Japan), comprimento de leitura de 2,4 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e o raio da ponta ativa de 5 μm . Foram realizadas quatro medidas para cada corpo de prova (duas de cada lado) e a média entre as leituras foi determinada como o valor da R_a (μm). Selecionaram-se para os testes microbiológicos os corpos de prova que possuíam rugosidade superficial entre 2,7 e 3,7 μm (Panariello et al. ⁵⁴ 2015; Zissis et al. ⁵⁵ 2000).

4.1.8 Coleta da saliva

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE 79249417.0.0000.5416. ANEXO A), saliva não estimulada foi coletada a partir de dois voluntários saudáveis com dentição natural completa, os quais receberam e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta foi realizada na mesma hora do dia, no período da manhã, ao longo de 30 minutos, após a higienização bucal, e os voluntários estavam em jejum. Os critérios de exclusão foram: pacientes com doenças sistêmicas; presença de cárie ativa e/ou doença periodontal; uso de antibiótico nos últimos 3 meses. A saliva coletada foi colocada em tubos de Falcon e, em seguida, foi levada para a centrifugação (3800 g, 4 °C, 10 min) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração (filtro com membrana de 0,22 µm, Corning, Corning, NY, EUA). Alíquotas foram armazenadas a -20 °C até sua utilização.

4.1.9 Formação do biofilme sobre as amostras

Previamente aos testes microbiológicos, as amostras de resina acrílica foram expostas a luz ultravioleta sob condições secas durante 20 minutos (de cada lado) para desinfecção (Jorge et al. ^{56, 57, 58, 59} 2004, 2006, 2007, 2009). Este procedimento foi adotado por preservar as propriedades da resina acrílica.

Após o procedimento de desinfecção em luz ultravioleta, as amostras foram colocadas, individualmente, em cada orifício de uma placa de 24 poços. Sobre cada amostra, 2 mL da saliva filtrada foram acrescentados em cada orifício e a placa foi incubada em estufa, à 37°C, durante 90 minutos, para formação da película salivar. Em seguida, foi realizada a formação de um biofilme de 48 horas. Para isso, 750 µL do meio de cultura, contendo as células fúngicas na concentração de 1×10^6 células/mL, complementado com 750 µL de meio RPMI-1640 tamponado, com MOPS pH 7,0, foram adicionados a cada poço, e depois levados para incubação a 37 °C, em agitador orbital (75 rpm) durante 90 minutos (adesão inicial). Posteriormente, as células não

aderidas foram removidas das amostras por meio de lavagem do corpo de prova com tampão PBS estéril, por duas vezes, e 1500 µL de meio de cultura RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH de 7,0) foram colocados em cada poço da placa para formação do biofilme. A placa foi levada para incubação durante 24 horas a 37 °C sob agitação orbital (75 rpm). Após as 24 horas, 750 µL de meio foram retirados dos poços e o mesmo volume de RPMI-1640 tamponado com MOPS fresco (pH 7,0) foi adicionado. A placa de 24 poços, contendo as amostras, foi, então, incubada novamente durante mais 24 horas, totalizando 48 horas de formação de um biofilme maduro. Após 48 horas, o meio foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por lavagem dos biofilmes duas vezes com tampão PBS estéril.

4.1.10 Atividade antifúngica dos extratos das espécies de *Cryptocarya*

Após a formação do biofilme maduro (48 horas) sobre as amostras de resina acrílica, cada poço da placa de 24 orifícios, contendo as amostras, foi preenchido com 1 mL das seguintes soluções:

GC: solução de extratos de *Cryptocarya ssp* (*moschata* e *mandioccana*) na CFMb (previamente determinada);

CP: solução de nistatina a 100.000 IU/mL (controle positivo): usado na contagem de unidades formadoras de colônias

CN: solução de PBS (controle negativo)

As soluções permaneceram nos poços por um período de 60 minutos (Izumida et al.⁵² 2014). Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS para remoção dos excessos das diferentes soluções e das células não aderidas. Para avaliação do efeito antimicrobiano das diferentes soluções, foram realizados os testes de avaliação do metabolismo celular (*AlamarBlue*® assay) e contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL). As análises foram realizadas em triplicata em 3 ocasiões distintas.

4.1.11 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®

O metabolismo celular do biofilme de *Candida albicans* foi avaliado usando o teste *AlamarBlue*®, uma técnica que mede a viabilidade celular por meio da atividade das enzimas mitocondriais. A mudança de cor no teste representa a atividade metabólica do biofilme. Após o período de contato das amostras (n=3) com as soluções de cada grupo experimental, as mesmas foram lavadas 2 vezes com PBS e foram colocados 1500 µL meio de cultura novo em cada orifício da placa. Em seguida, foram acrescentados 150 µL de solução de *AlamarBlue*®. As placas foram, então, colocadas na incubadora de agitação orbital a 37°C e 76 rpm. Após 4 horas foi realizada a leitura de fluorescência. A fluorescência das amostras foi medida usando Fluoroskan Ascent FL com filtro de excitação a 560 nm (A560) e emissão 590 nm (A590).

4.1.12 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)

Para a quantificação de micro-organismos, as amostras contendo o biofilme de *C. albicans* foram transferidas para tubos Falcon contendo 4,5 mL de PBS puro e agitados durante 1 minuto em vórtex para o desprendimento das células. Em seguida, o processo de diluição seriada foi realizado em tubos eppendorf contendo 900 µL de PBS puro por meio da transferência de alíquotas de 100 µL da solução original. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas. Duas alíquotas de 10 µL da diluição de 10^{-3} e de 10^{-4} foram gotejadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud com cloranfenicol (SDA). A seguir, todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as placas foram posicionadas sobre um contador de colônias manual e o número de colônias foi determinado. O número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n / q$. Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida (de 3 a 4) e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas (0,010 mL = 10 µL).

4.1.13 Microscopia de varredura confocal a laser (MVCL)

Para este teste, foi formado biofilme sobre corpos de prova (posicionados em placas de cultura de 24 orifícios) e sobre o fundo dos poços de uma placa de 24 poços. Após a formação do biofilme foi feita a aplicação dos tratamentos: um grupo recebeu o extrato de folha de *C. moschatta* mantendo em contato por 10 min, outro grupo recebeu o extrato por 20 min, o grupo controle permaneceu com PBS, um grupo recebeu nistatina por 10 min, e outro nistatina por 20 min. Posteriormente foram adicionados 10 mL de solução salina contendo 2 mL de corante Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), contendo SYTO-9 e Propidium iodide (PI) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) sobre as amostras. As placas com e sem os corpos de prova foram, então, incubadas por 15 minutos no escuro. A máxima excitação e emissão utilizada foi de aproximadamente 480/500 nm para SYTO-9 e 490/635 nm para PI. Posteriormente, imagens foram obtidas com um microscópio confocal. As células vivas são coradas em verde e as mortas em vermelho.

4.1.14 Desenho do estudo

A presente proposta trata-se de um estudo laboratorial (in vitro). Primeiramente, foram determinadas as CIM, CFM, CFMb da planta medicinal testada (*Cryptocarya sp*). Em seguida, o efeito antifúngico dessa planta sobre o biofilme de *Candida albicans* em amostras de resina foi avaliado pelos testes de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e *AlamarBlue*® (contagem de células por fluorescência). Para as análises em biofilme, as concentrações de 10 e 15 vezes da CIM foram avaliadas. Os testes foram realizados em triplicatas, em 3 ocasiões diferentes (n=9). Além disso, foram confeccionadas 2 amostras de cada grupo experimental para análise do biofilme em confocal.

4.1.15 Análise estatística

Os valores de UFC/mL são extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Assim, as contagens de micro-organismos, em UFC/mL, foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$) para fins de análise estatística. Em seguida, os dados foram analisados estatisticamente usando os testes de Kruskal-Wallis e Dunn (post hoc). Os dados dos valores de fluorescência (*AlamarBlue*®) foram submetidos ao teste de ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

4.2 Estudo II (*in vitro*)

Avaliar a citotoxicidade de extratos de espécies *Cryptocarya* sobre células epiteliais por meio do teste *AlamarBlue*®.

4.2.1 Cultura e manutenção das células

O efeito citotóxico de extratos das espécies de *Cryptocarya* foi avaliado pelo método de cultura de células. Células NOK (queratinócitos orais normais) foram propagadas em meio de cultura de DMEM suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 ug/mL de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para culturas de células com tampa contendo um filtro que permitiu a passagem de CO₂ (Costar, CorningIncorporated, Corning – NY – USA). Esses frascos foram incubados em estufa para cultura de células (Forma Scientific, Marietta – OH – USA) com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada (Jorge et al. ^{56, 57, 58, 59} 2004, 2006, 2007, 2009; Tay et al. ⁶⁰ 2012).

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de três dias de incubação, até se proceder ao teste de citotoxicidade. Para isso, foi colocado 1 mL de tripsina com a finalidade de desagregar as células da parede do fundo do frasco e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1 mL foi colocado em novo frasco, sendo acrescidos 9 mL de meio de cultura suplementado, com o auxílio de uma pipeta graduada e um pipetador automático. Cada frasco foi, então, tampado e levado à estufa para a formação de nova

confluência de células. É importante salientar que todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e luz UV.

4.2.2 Quantificação das células

Para a realização dos testes de citotoxicidade, uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa adicionando-se tripsina. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 mL e levada para uma centrífuga especial autobalanceável (Fanem Ltda, São Paulo – SP – Brasil), por 10 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 ug/ml de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 10 uL foram retirados e adicionados a 90 uL de corante azul de Tripán (Merck - Indústrias Químicas Rio de Janeiro – RJ – Brasil). Dessa solução, 10 uL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg – Alemanha) onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Nikon – modelo YS 100, Tokyo – Japão) com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL de meio de cultura para posterior utilização no teste de citotoxicidade, variando-se apenas o volume da suspensão.

4.2.3 Avaliação da proliferação celular por meio do teste AlamarBlue®

A proliferação celular de queratinócitos orais normais (NOK) também foi monitorada usando o teste *AlamarBlue*®, uma técnica que mede a viabilidade celular por meio da atividade das enzimas mitocondriais. A mudança de cor no teste representa a atividade metabólica das células. Para a realização do teste, 100 uL da suspensão composta de $1,0 \times 10^5$ células/mL, ou seja, $1,0 \times 10^4$ células/mL, foram colocados em cada compartimento de uma placa com 96 orifícios, incubada em estufa com 5% de CO₂,

a 37°C por 24 horas. Após tal período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, permanecendo as células aderidas no fundo da placa. Em seguida foram adicionados 100 uL de meio de cultura novo contendo a solução da planta medicinal nas concentrações selecionadas previamente. Em seguida, foram acrescentados 10 µL de solução de *AlamarBlue*®, foi realizada a primeira leitura de fluorescência após 6 horas, segunda leitura após 12 horas e a terceira leitura após 24 horas. A fluorescência das amostras foi medida usando Fluoroskan Ascent a 560 nm (A560) e 590 nm (A590).

4.2.4 Desenho do estudo

A presente proposta trata-se de um estudo laboratorial (in vitro). Para cada grupo experimental foram destinados quatro orifícios da placa de 96 orifícios e o teste de proliferação celular *AlamarBlue*® foi realizado em três ocasiões distintas. Dessa forma, cada condição experimental ficou com um número de 12 replicatas. A leitura foi realizada após 6, 12 e 24 horas.

4.2.5 Análise estatística

Os resultados da citotoxicidade das espécies de *Cryptocarya* foram analisados de duas maneiras separadamente: uma análise quantitativa e outra qualitativa. Na análise quantitativa, os resultados do número de células viáveis foram tabulados e submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variância para verificar a distribuição dos dados amostrais. ANOVA mista (fator independente = grupos; fator dependente = tempo) e pós teste de Tukey foram realizados com nível de significância de 5%. Além disso, para complementar a análise estatística, o resultado de cada grupo experimental foi comparado com o grupo controle (considerado 100% de viabilidade) e as soluções dos extratos da planta foram classificados de acordo com o efeito citotóxico em (análise qualitativa): 0 – não citotóxico (inibição menor do que 25% em relação ao grupo controle), 1 – discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50% em relação ao grupo controle), 2 – moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e

75% em relação ao grupo controle) e 3 – intensamente citotóxico (inibição maior do que 75% em relação ao grupo controle).

4.3 Estudo III (*in vivo*)

Avaliar a eficácia do extrato de folha de *Cryptocarya moschatta* na inativação de biofilme de *Candida albicans* presente no dorso lingual de camundongos com candidose induzida e sua biocompatibilidade.

4.3.1 *Candida albicans* e condições de crescimento

Foram utilizados fungos da espécie *Candida albicans* ATCC 90028 que foram semeadas em placas de Petri sobre o meio de cultura Ágar Sabouraud com cloranfenicol (SDA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período de ativação, uma alçada da levedura recém-cultivada foi adicionada em frascos contendo 10 mL de RPMI 1640 e incubados em agitador orbital a 37°C por 16 horas, após isso as células foram centrifugadas a 4.000 rotações por minuto, durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram lavadas duas vezes com PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2). As células lavadas foram ressuspensas em 3 mL RPMI, e a densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada a uma concentração de 10⁷ células/mL, utilizando-se espectrofotômetro (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil

4.3.2 Animais

Previamente aos experimentos, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo CEUA: 36/2017. ANEXO B).

Foram utilizados 50 camundongos da linhagem Swiss mice, com aproximadamente 6 semanas de vida. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Araraquara. Até que se iniciasse os

experimentos, os camundongos foram mantidos em gaiolas, com cinco animais em cada, e foram alimentados com ração e água ad libitum.

Anteriormente ao início de cada experimento, a ausência de leveduras de gênero *Candida spp* na cavidade bucal e língua de todos os camundongos foi avaliada. Para isso, foi realizada a coleta de material da mucosa bucal de cada animal com um mini swab estéril. Em seguida, o swab foi semeado em placas de Petri contendo meio SDA. As placas foram incubadas a 37° C por 48 horas. Após este período, a ausência de crescimento de fungos nas placas de Petri de todos os animais foi observada.

4.3.3 Indução de candidose em língua de camundongos

Para indução de candidose na língua dos camundongos foi utilizada a metodologia descrita por Takakura et al.⁶¹ (2003) e reproduzida por Mima et al.⁶² (2010), Alves⁶³ (2013) e Carmello et al.⁶⁴ (2016). Nestes estudos, os autores verificaram que a utilização de prednisolona, um glicocorticóide imunossupressor, associada à tetraciclina (antibiótico) e inoculação tópica de *Candida albicans*, é capaz de desenvolver lesões brancas no dorso lingual dos animais.

A imunossupressão dos animais foi realizada nos dias 1 e 5 do experimento (Esquema 1: Estudo III), por meio de duas injeções subcutâneas de prednisolona na dose de 100 mg/kg de massa corporal. Para a realização de tal procedimento, foi utilizado o medicamento imunossupressor acetato de metilpredinisolona 40 mg/mL. Uma quantidade de 0,1mL do medicamento foi colocada em uma seringa estéril de capacidade de 1mL e injetada na porção posterior da cabeça do animal, próximo à região de pescoço. A tetraciclina foi fornecida na água de beber do animal na concentração de 0,83 mg/mL, desde o primeiro dia de experimento, para prevenir o desenvolvimento de infecções bacterianas nos animais imunossuprimidos e para facilitar a infecção pela *Candida albicans*, uma vez que antibióticos de amplo espectro eliminam bactérias competidoras na cavidade oral. Os animais receberam o medicamento durante todo o período experimental. No dia 2 do experimento, após o preparo da suspensão de *Candida albicans* a 10⁷ UFC/mL, os animais foram sedados com 0,1 mL de cloridrato de clorpromazina 2mg/mL. Para isto, 0,05 mL do

medicamento foi aplicado intramuscularmente em cada fêmur do animal. Os animais sedados foram inoculados com a solução de *Candida albicans*. Para isto, a língua de cada animal foi delicadamente posicionada para fora da cavidade oral com o auxílio de uma pinça. Em seguida, cotonetes estéreis embebidos na suspensão do fungo foram friccionados por todo o dorso da língua dos animais sedados, por um período de 30 segundos. É importante lembrar que no dia 5 do experimento os animais receberam a segunda dose de imunossupressor de forma semelhante à descrita no primeiro dia.

4.3.4 Tratamento (grupos experimentais)

Após 48 horas da segunda imunossupressão (7º dia de experimento) foram iniciados os tratamentos de acordo com os grupos experimentais descritos abaixo (n=5).

CI/GC: os animais receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de extrato de folha de *Cryptocarya moschatta* na CFMb (0,045 g/mL)

CI/GN: os animais receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de nistatina a 100,000 IU/mL;

CI/ST: os animais receberam os procedimentos de indução de candidose oral e não receberam nenhum tipo de tratamento;

CI/GC-2: os animais receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de extrato de folha de *Cryptocarya moschatta* na CFMb ((0,045 g/mL) que foi reaplicada após 24h;

CI/GN-2: os animais receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de nistatina a 100,000 IU/mL, que foi reaplicada após 24h;

SI/ST: os animais não receberam os procedimentos de indução de candidose oral e não receberam nenhum tipo de tratamento;

SI/GC: os animais não receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de extratos de folha de *Cryptocarya moschatta* na CFMb (previamente determinada);

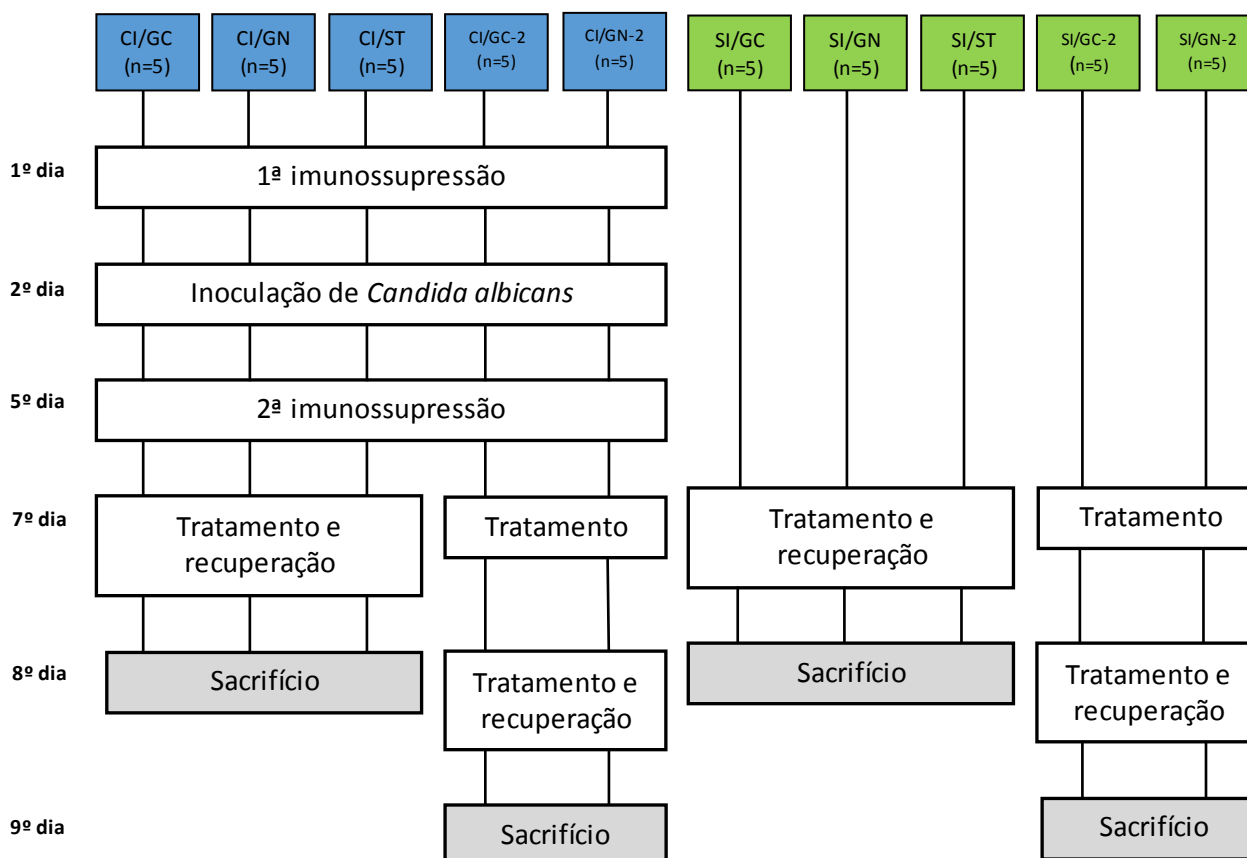
SI/GN: os animais não receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de nistatina a 100,000 IU/mL;

SI/GC-2: os animais não receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de extratos de folha de *Cryptocarya Moschatta* na CFMb (previamente determinada), que foi reaplicada após 24h;

SI/GN-2: os animais não receberam os procedimentos de indução de candidose oral e receberam uma solução de nistatina a 100,000 IU/mL, que foi reaplicada após 24h.

Os últimos 4 grupos acima descritos possibilitaram analisar, histologicamente, se as soluções terapêuticas causam reação inflamatória no dorso da língua do camundongo.

Para a aplicação dos tratamentos, os animais foram anestesiados intraperitonealmente através da injeção de 200 µL de solução anestésica contendo Ketamina (anestésico geral), Xilazina (relaxante muscular) e soro fisiológico, na proporção de 2:1:17, respectivamente. Após anestesia, os animais foram colocados em posição supina e, com o auxílio de uma pinça clínica, a língua dos camundongos foi cuidadosamente posicionada para fora da cavidade oral. Em seguida, foi realizada a aplicação tópica de 50 µL de cada tratamento proposto de acordo com os grupos experimentais. Em seguida, a língua dos animais foi posicionada no interior da cavidade oral e permaneceram em repouso durante 10 minutos. Decorrido este tempo, foi feita a recuperação de *Candida albicans* da língua dos animais por meio da coleta com mini-swabs estéreis que foram previamente embebidos em 1 mL de solução salina estéril. Para a coleta, os mini-swabs foram esfregados sobre o dorso das línguas dos animais durante 1 minuto.

Esquema 1 - Cronograma do estudo (Estudo III)

Fonte: Elaboração própria.

4.3.5 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)

Após a recuperação de *Candida albicans*, foram realizadas diluições seriadas a partir das amostras contidas nos tubos de ensaio contendo o mini-swab e 1 mL de solução salina. Inicialmente, esses tubos de ensaio foram vigorosamente agitados durante 1 minuto para que houvesse desprendimento do fungo do swab para a solução salina. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi removida de cada amostra e transferida para um tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina estéril. Este tubo foi agitado vigorosamente e uma nova alíquota de 100 µL foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 µL de solução salina. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e, assim, diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} foram obtidas. As três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram utilizadas para a

realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura SDA. Para este procedimento, os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio. A seguir, alíquotas de 25 µL de cada diluição seriada foram pipetadas em duplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes das duas placas de Petri contendo o meio de cultura. Adicionalmente, alíquotas de 25 µL foram removidas dos tubos de ensaio que contém o mini-swab e foram transferidas diretamente para um quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidas à contagem de colônias. Para este procedimento, cada placa de Petri foi posicionada em um contador de colônias digital. A quantificação das colônias foi realizada e os números de unidades formadoras de colônias foram calculados.

Após a incubação das placas de Petri a 37 °C por 48 horas, foi realizado o cálculo do número de micro-organismos viáveis, em valores de UFC/mL. Para o cálculo desses valores, as colônias viáveis presentes nas placas de Petri de cada duplicata foram contadas com o contador de colônias digital. Após a contagem, foi obtida a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado utilizando-se a fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^{n/q}$. Nessa fórmula, “n” equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e “q” equivale à quantidade, em mL, pipetada de cada diluição nas placas de Petri.

4.3.6 Sacrifício dos animais e análise histológica

Os camundongos foram sacrificados com uma dose letal de ketamina (0,2 mL) injetada intramuscularmente no fêmur, 24 horas após os tratamentos descritos. A língua de cada animal foi removida cirurgicamente e colocada em cassetes, os quais foram identificados de acordo com o grupo experimental a que a amostra pertence. Os cassetes ficaram imersos em um recipiente com formol a 10% (pH 7,4) por 48 horas. Decorrido esse período, os mesmos ficaram sob água corrente por mais 24 horas. A

língua foi dividida transversalmente em três partes e apenas a porção central foi embebida em parafina para obtenção de secções de 6 µm. As amostras foram coradas por reagente ácido periódico de Schiff. A análise histológica foi realizada por um especialista em Patologia Oral, Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa. Foram avaliados os seguintes aspectos: presença/ausência de fungo e infiltrado inflamatório, integridade do tecido epitelial, resposta do tecido conjuntivo subjacente frente a estes procedimentos e estado do tecido muscular.

4.3.7 Desenho do estudo

Este estudo é um desenho experimental em animais (in vivo). Foram utilizados 50 camundongos sendo que, para cada condição avaliada, foram utilizados 5 animais. Esta decisão foi baseada em estudos prévios (Takakura et al.⁶¹ 2003; Mima et al.⁶² 2010; Alves⁶³ 2013; Carmello et al.⁶⁴ 2016). De cada animal foram coletadas amostras para plaqueamento e posterior contagem de unidades formadoras de colônias como descrito anteriormente. Além disso, análise histopatológica da língua de cada animal, nos diferentes grupos experimentais, também foi realizada, de acordo com o detalhamento feito anteriormente.

4.3.8 Análise estatística

Os valores de UFC/mL são extremamente elevados e, por isso, considerados de difícil avaliação. Assim, as contagens de micro-organismos, em UFC/mL, foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$) para fins de análise estatística. Os dados apresentaram normalidade e homoscedasticidade ($\alpha=0,05$) e foram analisados com inferências estatísticas paramétricas. Foi utilizada análise de variância, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo I (*in vitro*)

Avaliar a eficácia de diferentes espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* formados em amostras de resina acrílica para base de próteses.

5.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para as células planctônicas

Os testes para análise da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para as células planctônicas foram realizados para cada um dos extratos de folhas, frutos, cascas e troncos de *C. moschata*, *C. saligna* e *C. mandioccana*, em três ocasiões distintas. Para as espécies *C. moschata* e *C. mandioccana*, nos extratos obtidos das folhas e frutos, foi encontrado como resultado o mesmo valor de CIM e CFM, sendo este na diluição de 0,003 g/mL. A CIM é a concentração que inibiu o crescimento das células planctônicas e a CFM é a concentração que eliminou 100% das células planctônicas de *C. albicans*. Para os extratos de folhas e frutos de *C. Saligna*, mesmo aumentando a concentração até 0,015 g/mL, não foi encontrada eficácia contra as células de *C. albicans*, assim como os extratos obtidos a partir da casca ou tronco das três espécies. Somente os extratos que apresentaram atividade antifúngica foram utilizados nos próximos testes.

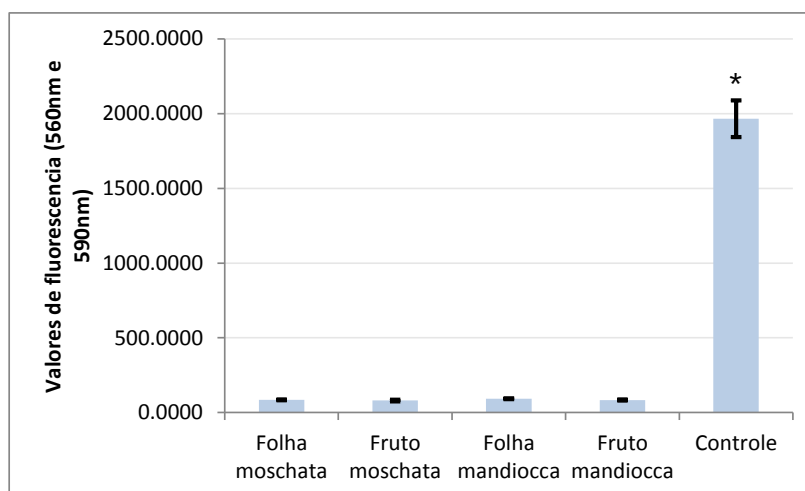
5.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima das células em biofilme (CFMb)

A Concentração Fungicida Mínima das células em biofilme (CFMb) foi igual a 15 vezes o valor do MIC, ou seja, 0,045 g/mL. Essa concentração, após 1 hora de contato com o biofilme formado sobre o fundo de poços de uma placa de 24 orifícios, inibiu completamente o biofilme, para os extratos de folhas e frutos das espécies de *Cryptocarya mandioccana* e *Cryptocarya moschatta*.

5.1.3 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®

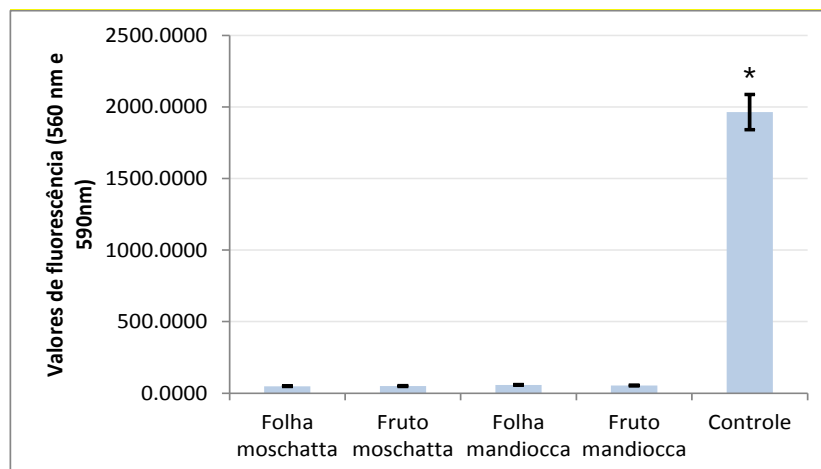
O metabolismo celular das células de *C. albicans* foi avaliado, primeiramente, na CFMb, equivalente à 15 vezes o valor da CIM. Além disso, para complementação dos resultados, a concentração de 10 vezes da CIM também foi avaliada. Os resultados mostraram que, para ambas as concentrações, houve diferença estatística entre os extratos testados e o grupo controle negativo, com redução significativa do metabolismo celular ($p < 0,05$). (Figura 1 e 2).

Figura 1- Valores de fluorescência das células de *C. albicans* submetidas ao tratamento com extratos de *Cryptocarya* na concentração de 0,030g/mL (10 vezes o valor da CIM).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Valores de fluorescência das células de *C. albicans* submetidas ao tratamento com extratos de *Cryptocarya* na concentração de 0,045 g/mL, 15 vezes o valor da CIM.

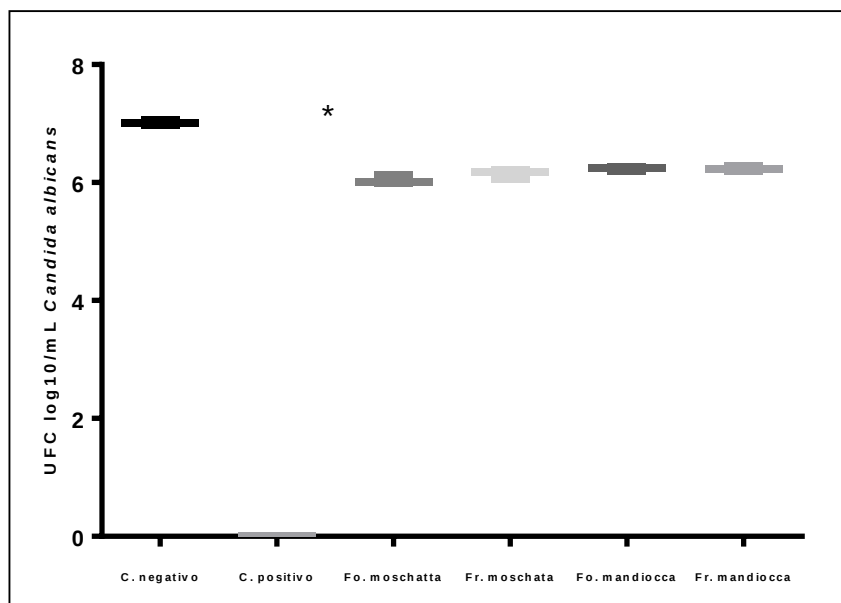


Fonte: Elaboração própria.

5.1.4 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)

O número de unidades formadoras de colônias do fungo *C. albicans* foi avaliado nas concentrações equivalente à 10 vezes (0,030 g/mL) e 15 vezes à CIM (0,045 g/mL). Em relação à concentração de 0,030 g/mL, os resultados mostraram que, para os grupos experimentais, houve redução de 1 log do número de UFC/mL em relação ao grupo controle negativo, porém sem diferença estatisticamente significativa. Diferença estatística foi encontrada apenas entre o grupo controle negativo e o grupo controle positivo (solução de nistatina a 100,000 IU/mL) (Figura 3).

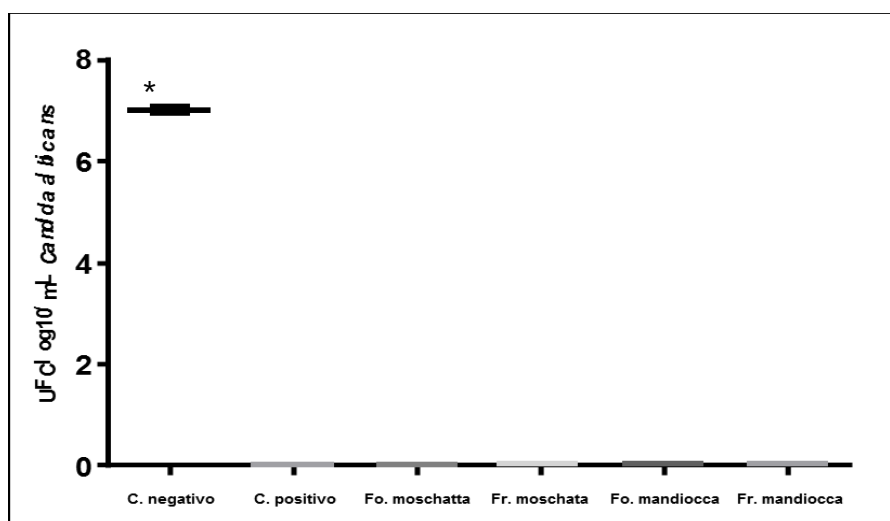
Figura 3 - Valores de UFC/mL das células de *C. albicans* submetidas ao tratamento com extratos de *Cryptocarya* na concentração 0,030 g/mL (10 vezes o valor da CIM).



Fonte: Elaboração própria.

A concentração de 0,045 g/mL inibiu completamente o crescimento celular, sendo a CFMb (concentração fungicida mínima para biofilme), por isso não foi realizada análise estatística desses dados (Figura 4).

Figura 4 - Valores de UFC/mL das células de *C. albicans* submetidas ao tratamento com extratos de *Cryptocarya* na concentração 0,045 g/mL= CFMb



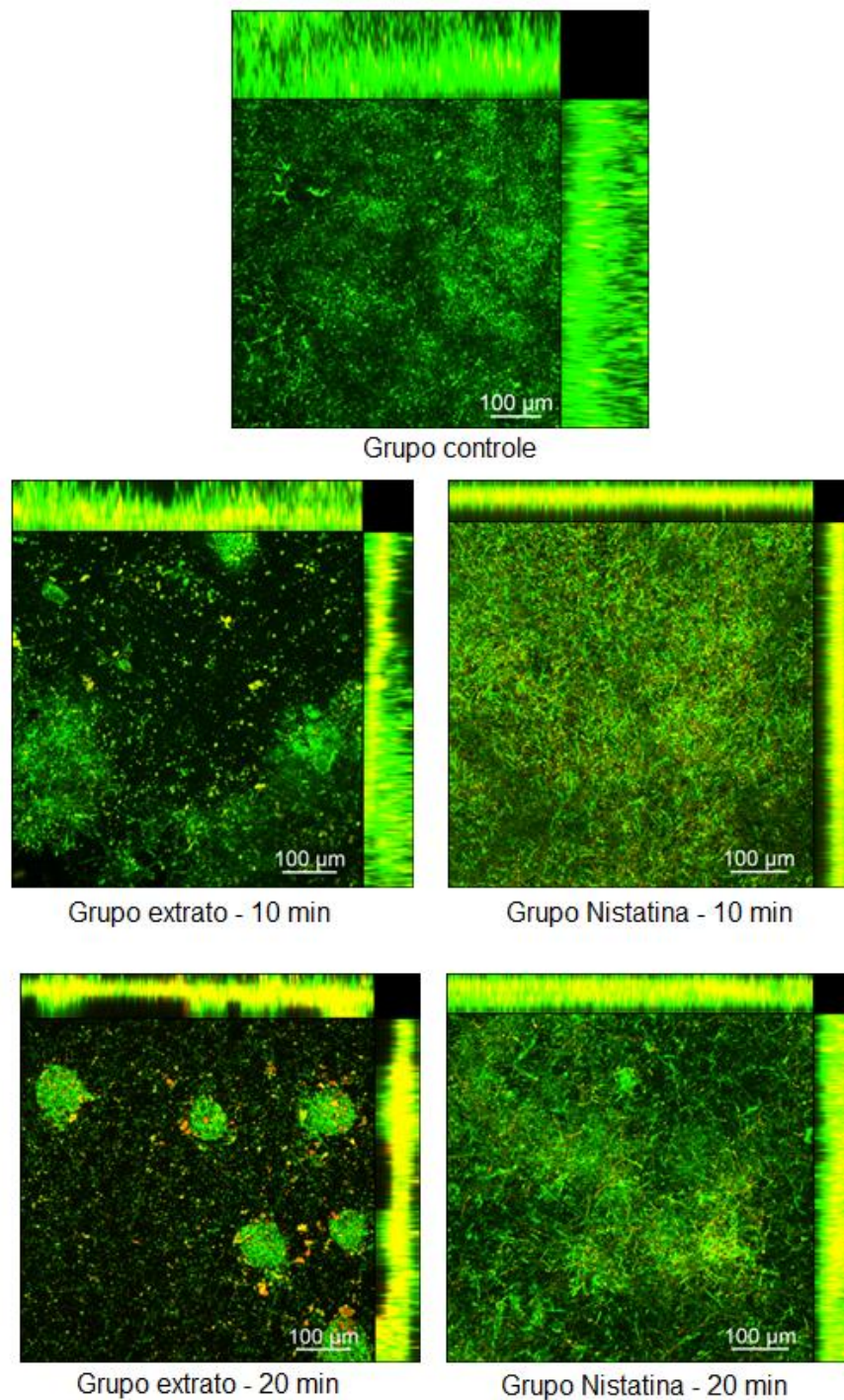
Fonte: Elaboração própria.

5.1.5 Microscopia de varredura confocal a laser (MVCL)

A Figura 5 mostra as imagens dos biofilmes de *C. albicans* formados sobre corpos de prova de resina acrílica após diferentes tratamentos, conforme os grupos experimentais. As imagens foram obtidas por MVCL. Podemos observar que todos os grupos apresentaram células vivas (verde) e que o grupo controle negativo apresentou maior espessura do biofilme quando comparado com os demais grupos.

Na análise quantitativa da microscopia de varredura confocal a laser obtivemos a razão (R) entre vivo/morto, em função da intensidade de fluorescência emitida pela amostra. Quando a razão R é maior que 1, significa que temos o predomínio de células vivas, se R igual a 1 temos 50% vivo e 50% morto, e se R é menor que 1 temos o predomínio de células mortas. Como resultado obtivemos que todos os grupos com biofilme formado sobre corpos de prova apresentaram predomínio de vivos, porém com grande diferença entre o grupo controle (R= 10,8) e os demais grupos: extrato 10 minutos (R=4,6), extrato 20 min (R=2,2), nistatina 10 min (R= 2,1) e nistatina 20 min (R= 3,4).

Figura 5 - Imagens de fluorescência confocal de biofilmes de *Candida albicans* formado sobre corpos de prova de resina acrílica e após tratamento com extrato de folha *C. moschatta*



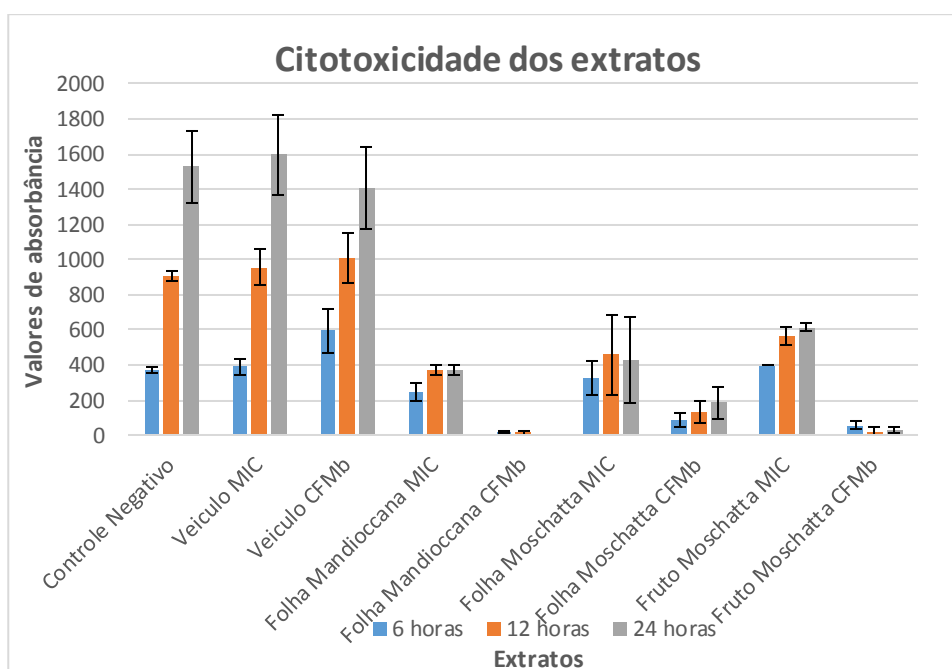
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Estudo II (*in vitro*)

Avaliar a citotoxicidade de extratos de *Cryptocarya sp* sobre células epiteliais por meio do teste *AlamarBlue*®.

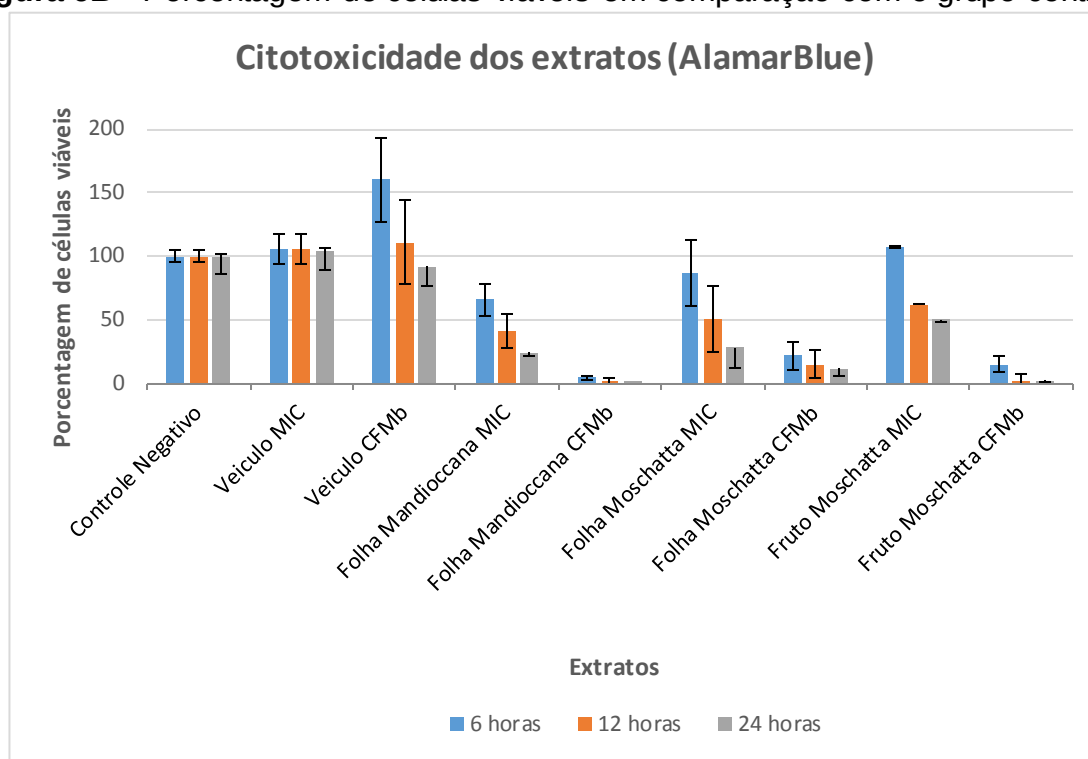
Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa entre os grupos, em todos os tempos (Figura 6A). Pôde-se observar que todos os extratos diminuíram a viabilidade celular em comparação com o grupo controle. Além disso, observou-se que houve aumento do número de células de acordo com o tempo. Quando os resultados foram convertidos em porcentagem e comparados com o grupo controle (Figura 6B), verificou-se que os extratos na concentração para biofilme CFMb (0,045 g/mL) foram considerados intensamente citotóxico, em todos os tempos. Nas CIMs (0,003 g/mL), os extratos variaram de não citotóxicos a intensamente citotóxico. Para todos os grupos, a porcentagem de células viáveis diminuiu com o tempo em relação ao controle.

Figura 6A - Citotoxicidade dos extratos em valores de fluorescência.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6B - Porcentagem de células viáveis em comparação com o grupo controle.



Fonte: Elaboração própria.

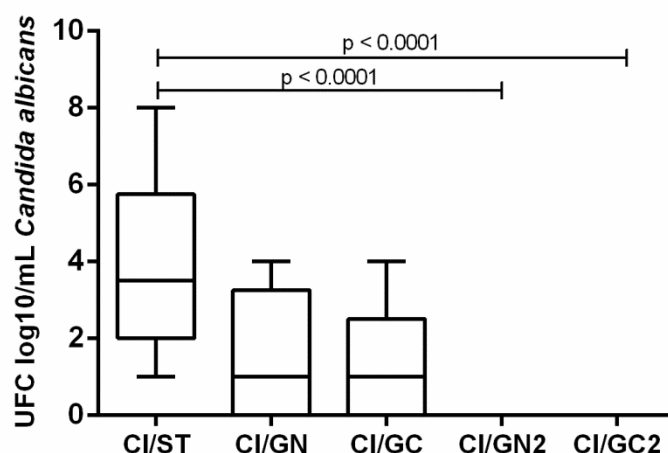
5.3 Estudo III (*in vivo*)

Avaliar a eficácia da *Cryptocarya sp* na inativação de biofilme de *Candida albicans* presente no dorso lingual de camundongos com candidose induzida.

5.3.1 Contagem do número de colônias viáveis (UFC/mL)

Os resultados de UFC/mL do biofilme coletado no dorso da língua dos animais, nos diferentes grupos experimentais foram transformados em logaritmo ($\log_{10}$) para fins de análise estatística (Figura 7). Os resultados mostraram que houve uma diminuição estatisticamente significativa em todos os grupos com relação ao grupo controle, sendo que os grupos que receberam duas aplicações de nistatina ou duas aplicações do extrato tiveram o número de UFC/mL reduzido a zero. Após uma aplicação, o número de UFC/mL foi reduzido em torno de 2 logs.

Figura 7- Resultados de UFC/mL do biofilme coletado no dorso da língua dos animais, nos diferentes grupos experimentais.

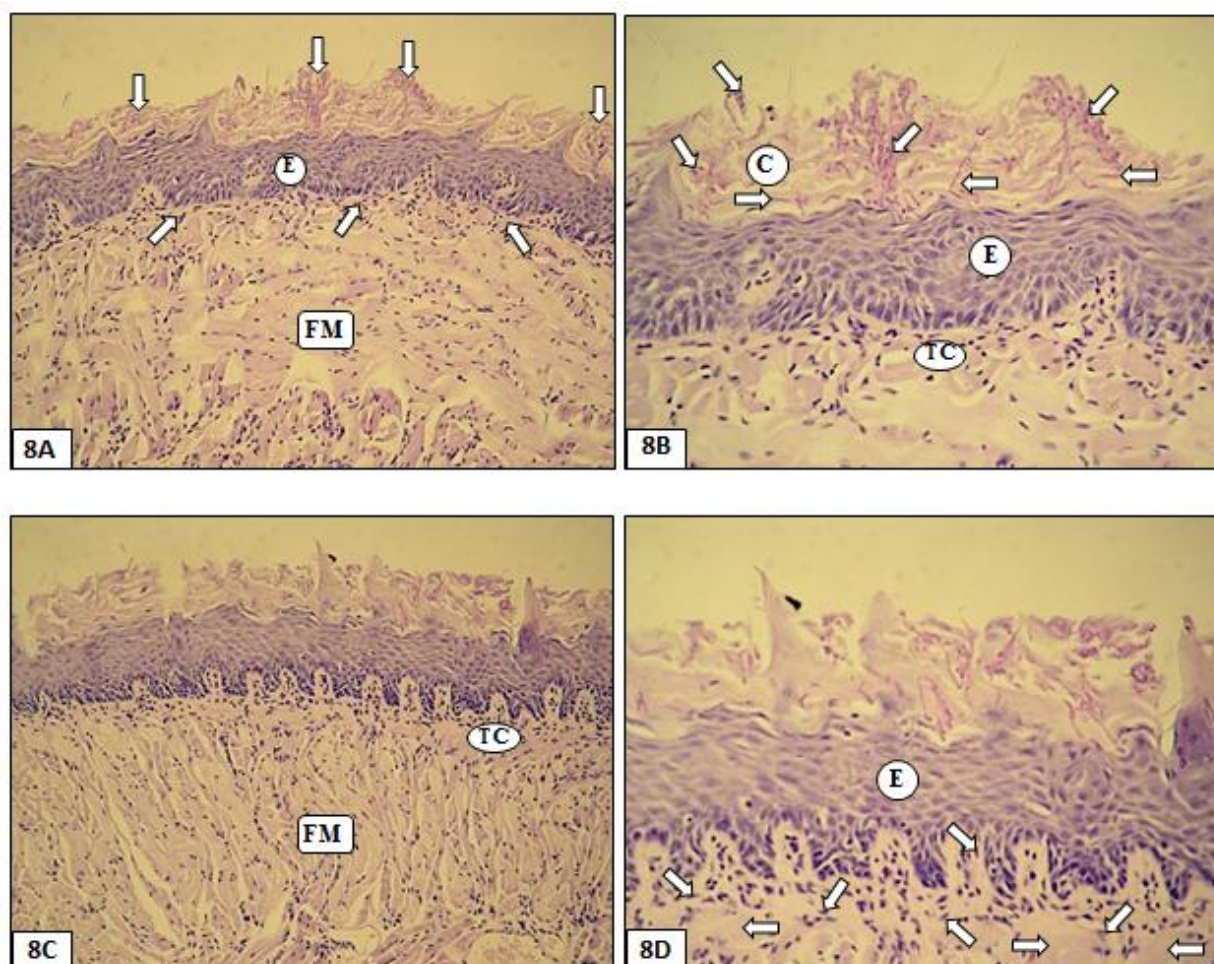


Fonte: Elaboração própria.

5.3.2 Análise histopatológica da língua dos camundongos

A análise histológica foi realizada pelo especialista em Patologia Oral, Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa. Os seguintes aspectos foram avaliados: presença/ausência de fungo e infiltrado inflamatório, integridade do tecido epitelial, resposta do tecido conjuntivo subjacente frente a estes procedimentos e estado do tecido muscular. Os resultados da análise para cada grupo experimental estão descritos a seguir

CI/ST – Neste grupo, onde a infecção foi induzida, porém nenhum tratamento foi realizado, os cortes histológicos revelaram presença de leveduras, hifas e pseudo-hifas em meio a uma espessa camada de ceratina localizada na superfície dorsal da língua dos animais. O epitélio se apresentava contínuo, sem evidências de invasão de micro-organismos no seu interior, sendo que a camada basal estava íntegra (Figura 8 A/B). O tecido conjuntivo subjacente não exibia alterações estruturais, sendo que numerosos fibroblastos se localizavam dispersos em meio a delgada camada de matriz extracelular rica em colágeno. Nas áreas mais profundas da língua, o tecido muscular se apresentava íntegro, com numerosos feixes de fibras normalmente distribuídos (Figura 8 A/B/C/D).

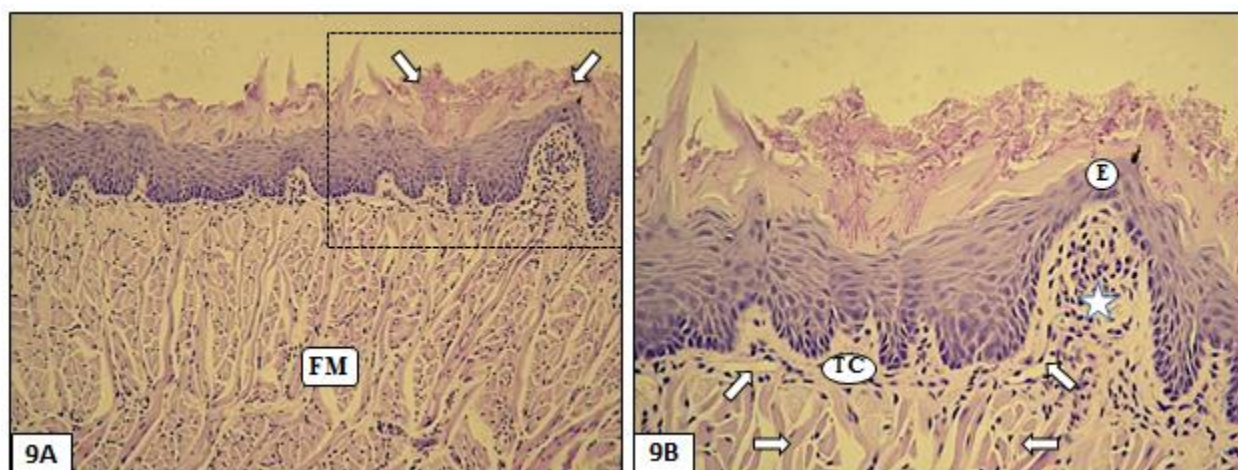
Figura 8 – imagens 8A 8B 8C E 8D

A) Espessa camada de ceratina contaminada (setas verticais) recobre o epitélio (E) íntegro. O delgado tecido conjuntivo subjacente se apresenta normal (setas oblíquas), sendo possível observar os feixes de fibras musculares (FM) adequadamente distribuídos (125x). B) Detalhe da Figura 8A, onde a contaminação, caracterizada pela presença de leveduras, hifas e pseudo-hifas (setas), é observada apenas em meio a espessa camada de ceratina (C). Note que a camada basal do epitélio pavimentoso estratificado é contínua, sendo que não há inflamação no tecido conjuntivo (TC) subjacente (250x). C) Imediatamente abaixo do epitélio (E), pode ser observado uma delgada camada de tecido conjuntivo e uma região ampla e profunda de tecido muscular normal (125x). D) A delgada camada de tecido conjuntivo exibe numerosos fibroblastos (setas oblíquas) e poucas células inflamatórias mononucleares em meio a amplas áreas de colágeno (setas horizontais; 250x).

Fonte: Elaboração própria.

Em dois espécimes, onde maior contaminação foi identificada em meio à ceratina, discreto infiltrado inflamatório mononuclear, associado com vasodilação pontual, foi observado no tecido conjuntivo imediatamente abaixo de algumas áreas delgadas do epitélio, porém que ainda se mantiveram íntegras (Figura 9A/B). Nestes espécimes, o tecido muscular superficial e profundo apresentavam características histológicas de normalidade.

Figura 9 – Imagens 9A e 9B

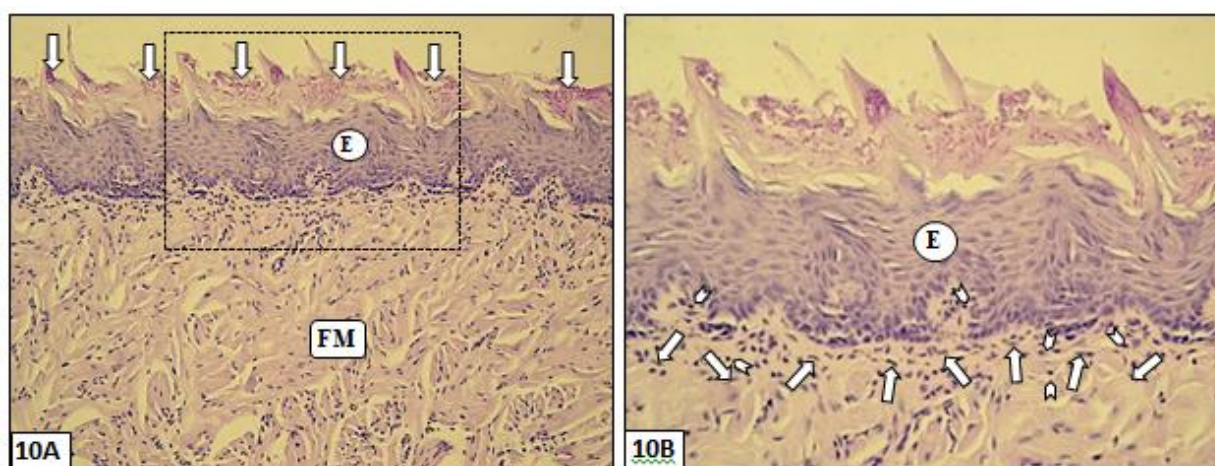


A) Uma área localizada de maior contaminação da hiperqueratina pode ser observada (setas oblíquas). Porém, as fibras musculares (FM) presentes na região superficial e profunda da língua se mantiveram organizadas em feixes homogeneamente distribuídos (125x). B) Detalhe da área demarcada na Figura 9A, onde uma camada delgada, porém íntegra de epitélio (E) pode ser identificada. Note que o tecido conjuntivo (TC) subjacente exibe fibroblastos em meio a matriz extracelular rica em colágeno, bem como alguns capilares sanguíneos dilatados (setas oblíquas) próximos a uma área de acúmulo de células inflamatórias monocucleares (estrela). O tecido muscular superficial (setas horizontais) exibe características histológicas de normalidade (250x).

Fonte: Elaboração própria.

C/GN – Neste grupo, a infecção na mucosa lingual foi induzida e o tratamento realizado por meio da administração de uma solução de nistatina a 100,000 IU/mL. Os cortes histológicos analisados revelaram que o epitélio contínuo e íntegro estava recoberto com delgada camada de ceratina contendo *C. albinas* (leveduras, hifas e pseudo-hifas). O delgado tecido conjuntivo subjacente exibia muitos fibroblastos em meio a matriz celular colagenosa, sendo que o tecido muscular superficial e profundo apresentavam características histológicas de normalidade (Figura 10A/B).

Figura 10- Imagens 10A e 10B



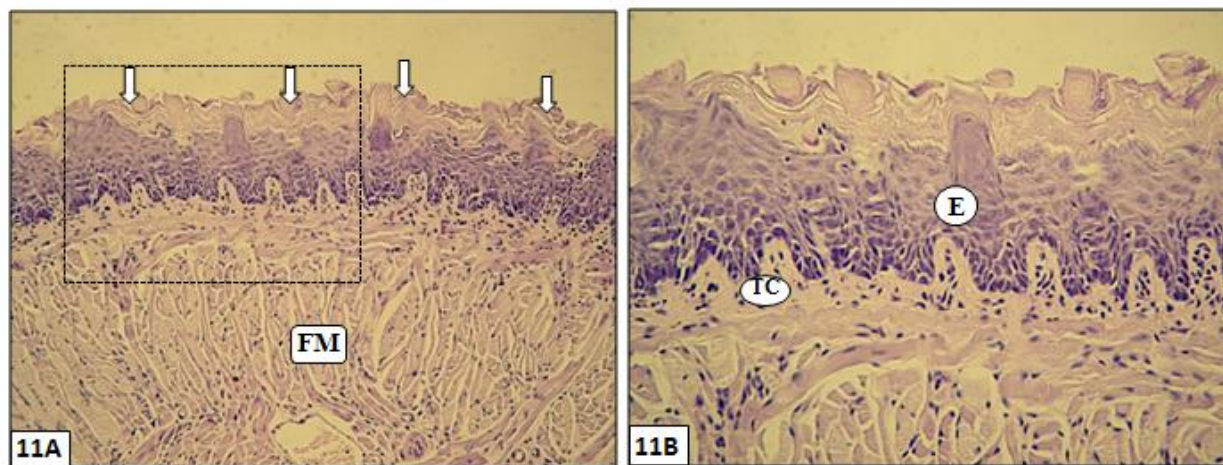
A) Espessa camada de ceratina contaminada com *C. albicans* (setas) recobre o epitélio pavimentoso estratificado, o qual se apresenta íntegro. Note que um conteúdo celular normal se apresenta em toda extensão do tecido conjuntivo localizado imediatamente abaixo do epitélio (E). As fibras musculares (FM), organizadas em feixes, exibem distribuição homogênea na região superficial e profunda da língua. B) Detalhe da área demarcada na Figura 10A. Note que subjacente ao epitélio (E), existe uma camada de tecido conjuntivo contendo muitos fibroblastos (setas) em meio a matriz extracelular rica em colágeno. Poucas células inflamatórias mononucleares são observadas (setas menores).

Fonte: Elaboração própria.

C/GC – Após indução da candidose lingual e tratamento com o extrato da folha de *Cryptocarya moschatta* na CFMb (0,045 g/mL), os cortes histológicos apresentaram resultados semelhantes aos observados para o grupo C/GN. Porém, em um dos

espécimes, reduzida quantidade de *C. albicans* foi detectada em meio a ceratina (Figura 11A/B).

Figura 11- Imagens 11A e 11B

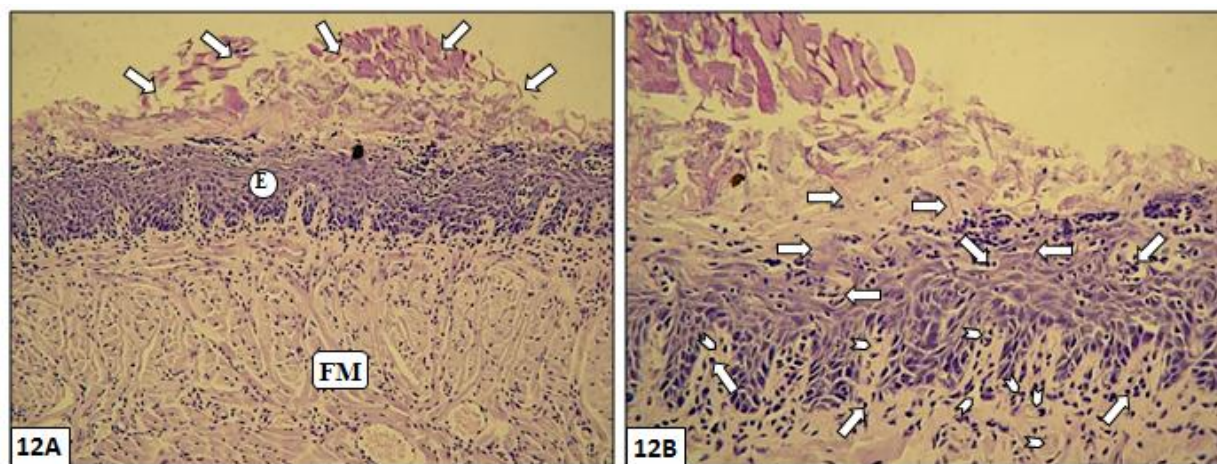


A) Espessa camada de ceratina (setas) pode ser observada recobrindo o epitélio pavimentoso estratificado, o qual se apresenta íntegro. O tecido conjuntivo subjacente, bem como o tecido muscular (FM) superficial e profundo exibem características histológicas de normalidade. B) Detalhe da área demarcada na Figura 11A. A espessa camada de ceratina sobre o epitélio (E) apresenta reduzida contaminação com *C. albicans*. Nenhuma resposta inflamatória foi observada no tecido conjuntivo (TC) subjacente ao epitélio íntegro.

Fonte: Elaboração própria.

Num outro único espécime deste grupo, os cortes histológicos evidenciaram que a espessa camada de ceratina apresentava intensa contaminação fúngica (leveduras, hifas e pseudo-hifas) pontual, a qual invadiu superficialmente o epitélio. Neste caso isolado, discreta resposta inflamatória com predomínio de células mononucleares aconteceu em áreas menos espessas do epitélio, o qual se manteve íntegro em toda sua extensão (Figura 12A/B).

Figura 12 – Imagens 12A e 12B

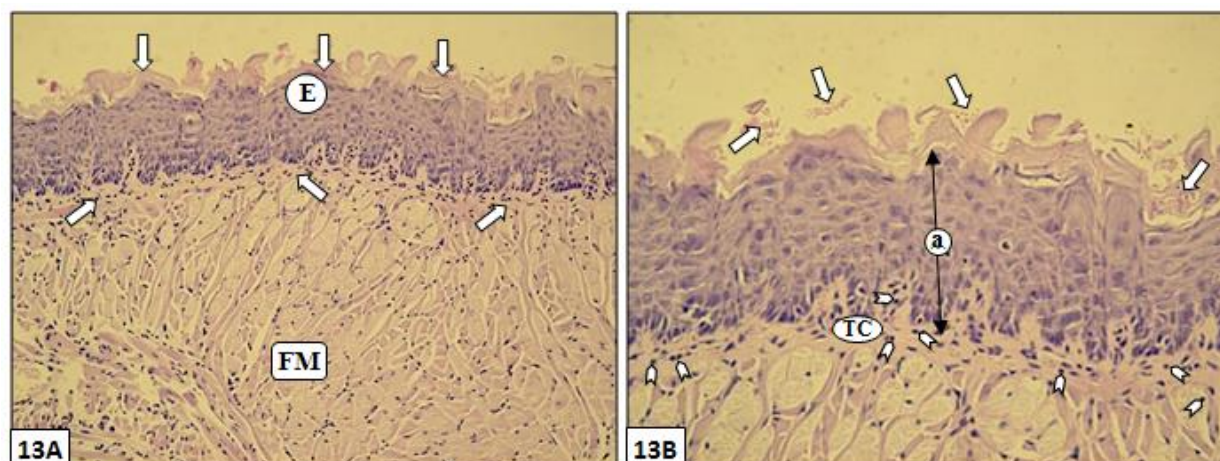


A) Espessa camada de ceratina contaminada (setas oblíquas) recobre uma camada íntegra de epitélio (E). O tecido conjuntivo subjacente apresenta aumento de celularidade em áreas pontuais, sendo possível observar que os feixes de fibras musculares (FM) estão normalmente distribuídos nas regiões superficial e profunda da língua. B) Presença de *C. albicans* no interior da ceratina, bem como na área mais superficial do epitélio (setas horizontais) pode ser observada, sendo que células inflamatórias mononucleares são vistas nas camadas mais delgadas deste tecido de revestimento (setas oblíquas). Discreta proliferação de capilares (setas menores) também ocorreu no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio com camada basal íntegra.

Fonte: Elaboração própria.

CI/GN2 – Neste grupo, onde a infecção foi induzida na língua dos animais e a terapia com a solução de nistatina a 100,000 IU/mL foi repetida após 24 horas, os cortes histológicos da maioria dos espécimes revelaram, sobre a superfície dorsal da língua dos animais, a presença de delgada camada de ceratina livre de contaminação. Em apenas um espécime, foi observado áreas pontuais de ceratina com discreta contaminação com *C. albicans*. Neste caso único, discreto espessamento do epitélio (acantose) foi observado (Figura 13A/B). Abaixo do epitélio íntegro e contínuo, foi observado uma camada de tecido conjuntivo com muitos fibroblastos e uma discreta quantidade de células inflamatórias mononucleares em meio a ampla matriz extracelular rica em colágeno. O tecido muscular superficial e profundo exibiam numerosos feixes de fibras normalmente distribuídos.

Figura 13 – Imagens 13A e 13B

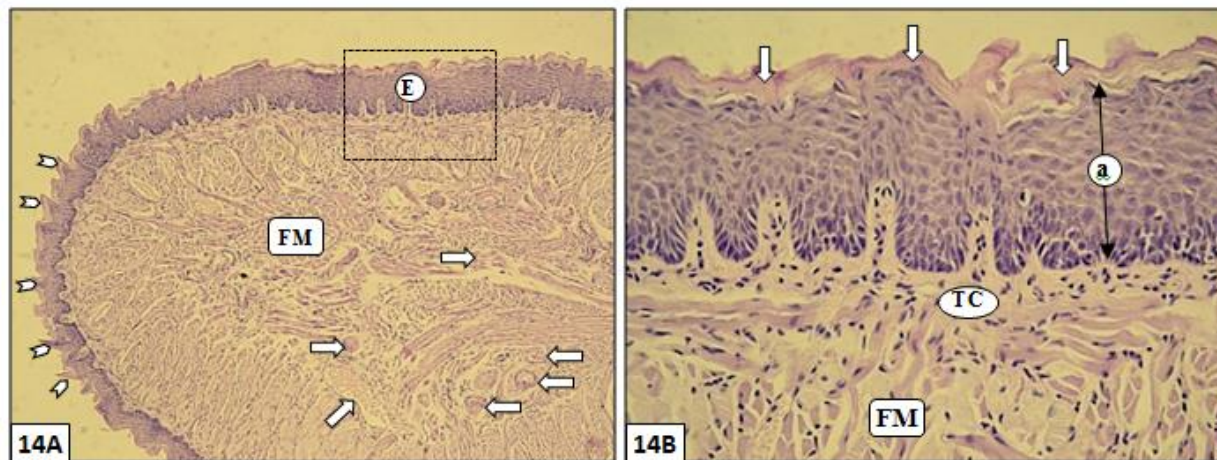


A) Delgada camada de ceratina (setas verticais) recobre o tecido epitelial (E) íntegro. O tecido conjuntivo subjacente pode ser claramente observado (setas oblíquas), sendo que abaixo dele se encontram muitas fibras musculares superficiais e profundas (FM) adequadamente distribuídas (125x). B) Detalhe da Figura 13A, onde discreta contaminação, caracterizada pela presença de leveduras e pseudo-hifas (setas), persiste no interior e superfície da camada de ceratina. Note que além da contínua camada de epitélio pavimentoso estratificado ligeiramente acantótico (a), foi possível identificar um tecido conjuntivo (TC) subjacente com presença de discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares (setas) (250x).

Fonte: Elaboração própria.

CI/GC2 – Neste grupo, a candidose da mucosa lingual foi induzida e o tratamento realizado por meio da administração imediata e reaplicação após 24 horas, de uma solução de extrato de folha de *Cryptocarya moschatta* na CFMb (0,045 g/mL). Os cortes histológicos da maioria dos espécimes analisados revelaram que o epitélio contínuo e íntegro, porém sem praticamente emitir projeções, se manteve recoberto com uma delgada camada de ceratina livre de contaminação (Figuras 14A/B e 15A/B). O tecido conjuntivo subjacente exibia muitos fibroblastos em meio a matriz extracelular colagenosa, sendo que o tecido muscular superficial e profundo apresentavam características histológicas de normalidade.

Figura 14 - Imagens 14A e 14B

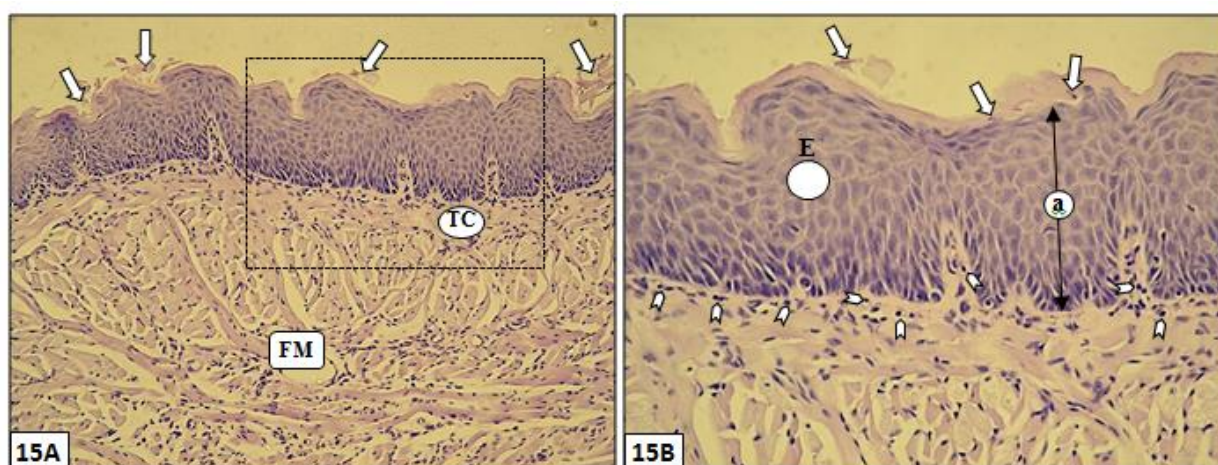


A) Visão geral da língua, onde o epitélio de revestimento exibe integridade e não há sinais de inflamação no tecido conjuntivo e muscular subjacentes. Note que o epitélio (E) da superfície dorsal praticamente não exibe projeções, tal como se observa na região lateral (setas menores). Na região central da língua há numerosos ductos de glândulas salivares (setas horizontais) e vasos sanguíneos de amplo calibre (seta oblíqua) em meio ao tecido muscular profundo normal (64x). B) Detalhe da área demarcada na Figura 14A. A delgada camada de ceratina (setas) não apresenta evidências de contaminação por *C. albicans*. O Epitélio (E) acantótico (a) se mostra íntegro e praticamente sem presença de papilas filiformes, sendo que o tecido conjuntivo (TC) e as fibras musculares (FM) superficiais exibem características histológicas de normalidade (250x).

Fonte: Elaboração própria.

Em apenas um espécime deste grupo, a delgada camada de ceratina apresentava poucas leveduras e pseudo-hifas no seu interior. O contínuo epitélio pavimentoso estratificado acantótico subjacente exibiu discreta presença, o qual não apresentava invasão de *C albicans*, exibiu camada basal definida, onde numerosos fibroblastos permaneciam entre matriz extracelular rica em colágeno. O tecido conjuntivo, bem como o tecido muscular superficial e profundo mostravam características histológicas de normalidade.

Figura 15 – Imagens 15A e 15B

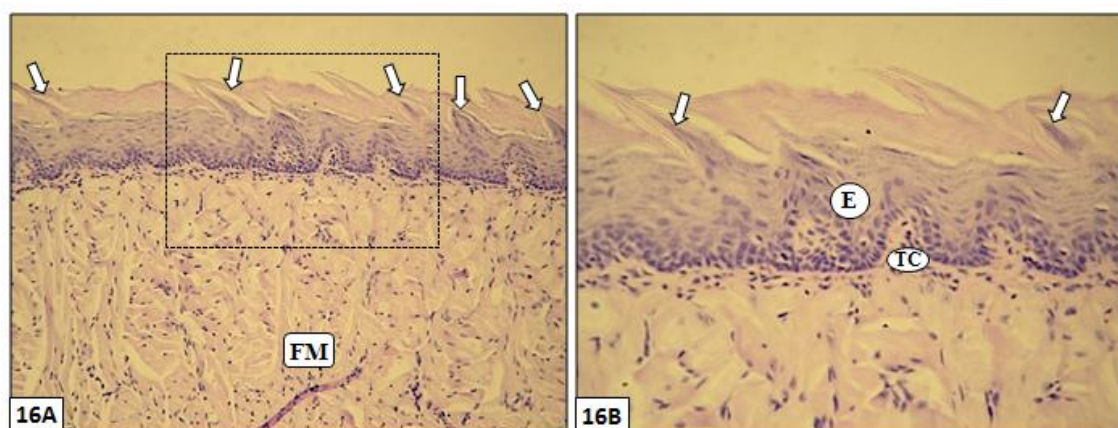


A) Delgada camada de ceratina contendo alguns focos de contaminação por *C albicans* (setas), recobre o tecido epitelial íntegro. O tecido conjuntivo (TC) subjacente exibe discreto infiltrado inflamatório mononuclear, sendo que abaixo são observados numerosos feixes de fibras musculares (FM) superficiais e profundas adequadamente distribuídos (125x). B) Detalhe da Figura 15A, onde discreta contaminação, caracterizada pela presença de leveduras e pseudo-hifas (setas), persiste no interior e superfície da camada de ceratina. Note que o epitélio pavimentoso estratificado acantótico (a) está contínuo, sendo que poucas células inflamatórias mononucleares são identificadas (setas menores) no tecido conjuntivo subjacente (250x).

Fonte: Elaboração própria.

SI/ST – Neste grupo, a infecção por *C. albicans* não foi induzida e nenhum tratamento foi realizado. Assim, os cortes histológicos evidenciaram uma mucosa lingual intacta e sadia, a qual deve ser usada para comparar as possíveis alterações estruturais e danos teciduais causados pelos procedimentos realizados nos demais grupos. De maneira geral, em todos os espécimes analisados deste grupo, foi possível observar o epitélio pavimentoso estratificado íntegro. Este tecido estava recoberto, em toda sua extensão, por uma espessa camada de ceratina, a qual definia, morfológicamente, as papilas filiformes comumente presentes na superfície dorsal do epitélio lingual normal. Delgada camada de tecido conjuntivo, caracterizado por numerosos fibroblastos distribuídos em meio a uma camada extracelular rica em colágeno, foi observada logo abaixo do epitélio. Numerosas fibras musculares organizadas em feixes superficiais e profundos determinaram as características de normalidade deste amplo tecido lingual (Figura 16A/B).

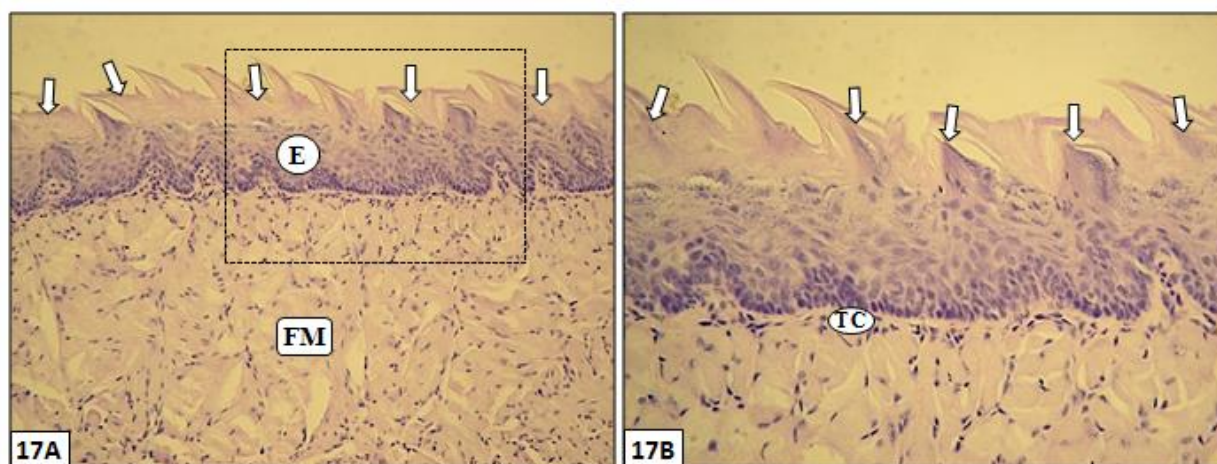
Figura 16 – Imagens 16A e 16B



A) Espessa camada de ceratina não contaminada recobre o tecido epitelial íntegro. Note que as projeções epiteliais, as quais estão revestidas por ceratina, dão origem às papilas filiformes linguais (setas). O tecido muscular superficial e profundo exibe numerosos feixes compostos por fibras musculares (FM) organizadas e bem distribuídas (125x). B) Detalhe da área demarcada na Figura 16A, onde é possível observar ceratina recobrindo algumas projeções epiteliais (setas). Imediatamente abaixo do epitélio (E) íntegro, é possível observar a delgada camada de tecido conjuntivo (TC) formada principalmente por fibroblastos em meio a matriz extracelular colagenosa (250x).

Fonte: Elaboração própria.

SI/GN; SI/GC; SI/GN2 e SI/GC2 – Em todos estes grupos, a infecção com *C albicans* não foi induzida nos animais. Porém, a mucosa lingual do dorso da língua dos camundongos recebeu uma ou duas aplicações da solução de nistatina a 100,000 IU/mL (SI/GN e SI-GN2) ou da solução do extrato de folha de *Cryptocarya moschatta* na CFMb (0,045 g/mL) (SI/GC e SI/GC-2). Os cortes histológicos obtidos dos espécimes destes grupos permitiram avaliar, de maneira comparativa com o grupo SI/ST (tecidos saudáveis), os possíveis efeitos adversos causados pelas substâncias antifúngicas e seus protocolos de aplicação. De maneira geral, os cortes histológicos obtidos destes quatro grupos evidenciaram, tal como observado no grupo SI-ST, epitélio íntegro cujas projeções eram recobertas por ceratina (papilas filiformes). O tecido conjuntivo subjacente, bem como o tecido muscular superficial e profundo exibiam características histológicas de normalidade. Desta maneira, duas imagens representativas destes grupos foram selecionadas para caracterizar a compatibilidade das substâncias antifúngicas avaliadas neste estudo (Figura 17A/B).

Figura 17 – Imagens 17A e 17B

Corte histológico obtido da língua de um animal do grupo SI/GC, o qual é representativo dos eventos histológicos observados dos outros três grupos. A) Epitélio (E) íntegro e com diversas projeções aparece recoberto por espessa camada de ceratina (setas). O tecido muscular superficial e profundo exhibe numerosos feixes compostos por fibras musculares (FM) organizadas e bem distribuídas (125x). B) Detalhe da área demarcada na Figura 17A. Além das papilas filiformes (setas), este corte histológico evidencia que a delgada camada de tecido conjuntivo (TC), bem como o tecido muscular superficial e profundo exibem características histológicas de normalidade (250x).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

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 traumática e restituição nutricional (Budtz-Jørgensen ¹² 1974; Budtz-Jørgensen ¹³ 2000; Neppelenbroek et al.¹⁴ 2008). Nos últimos anos, houve maior utilização de agentes antifúngicos, que resultou no desenvolvimento de resistência às drogas. Muitas pesquisas atuais buscam terapias alternativas para o tratamento de infecções, sendo a fitoterapia uma alternativa viável para atingir este objetivo. Além disso, o estudo de medicamentos naturais visa promover uma opção de baixo custo, acessível e não sintética para o tratamento de infecções fúngicas orais, tais como a estomatite protética.

Este estudo primeiramente avaliou a eficácia in vitro de extratos de espécies de *Cryptocarya* sobre biofilme de *Candida albicans* formados em amostras de resina acrílica para base de próteses e sua citotoxicidade em células epiteliais. Os resultados deste estudo 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. As concentrações testadas foram de 10 (0,03 g/mL) e 15 (0,045 g/mL) vezes o valor da CIM, tendo sido a última mais eficaz. Esses resultados são contrários aos reportados por Maciel et al. ³⁷ (2019), nos quais *C. aschersoniana* não teve ação contra espécies de *Candida spp.* A diferença entre os estudos poderia ser explicada em função das espécies estudadas, além disso, Maciel et al. ³⁷ (2019) avaliaram os óleos essenciais, enquanto que, no presente estudo, os extratos hidroalcóolicos das espécies foram avaliados. Todavia, os autores concluíram que o óleo pode atuar como um complemento terapêutico, principalmente devido ao seu efeito anti-inflamatório, podendo auxiliar na redução dos sintomas de uma lesão.

O mecanismo de ação dos extratos avaliados pode estar associado à sua composição. Uma vez que não foi realizada a análise cromatográfica dos extratos, somente suposições poderão ser realizadas. Zonaro ²⁷ (2016) realizou um estudo com objetivo de identificar os compostos presentes em três espécies brasileiras de *Cryptocarya* (*C. mandioccana*, *C. moschata* e *C. botelhensis*) com o uso das técnicas de HPLC-DAD-MS. Foi possível identificar que as classes de metabólitos presentes nas amostras foram alcaloides, flavonoides e estirilpironas. Tais substâncias encontradas no estudo de Zonaro ²⁷ (2016) podem estar relacionadas com a atividade antimicrobiana dos extratos. Huang et al. ⁴⁷ (2014) reportaram o efeito antimicrobiano dos flavonoides extraídos da *Cryptocarya concinna*. Da mesma forma, Nasrullah et al. ⁶⁵ (2013) comprovaram o efeito antimicrobiano de alcaloides extraídos da *Cryptocarya nigra*. Em relação às estirilpironas, estudo realizado por Reddy et al. ⁶⁶ (2010) demonstrou que as mesmas são substâncias biologicamente ativas que apresentam atividade anticâncer, antioxidante, antifúngica e antiviral.

É importante destacar que os resultados do presente estudo são promissores, uma vez que os extratos tiveram efeito antimicrobiano em biofilmes, os quais são bem mais resistentes do que as células planctônicas, sendo considerados um fator de virulência. Os biofilmes, definidos como comunidades estruturadas de micro-organismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica e envoltos por matriz polimérica extracelular (Douglas et al. ⁶⁷ 2003), são produzidos por diferentes espécies de *Candida spp*, apresentando variação com relação à produção, composição e atividade metabólica (Silva et al. ^{68, 69} 2009; 2010). Dentre essas espécies, *C. albicans* é considerada a espécie com maior capacidade de produção de biofilme. A atividade metabólica de um biofilme é importante em termos de patogenicidade, pois é indicativa de crescimento e reprodução celular dos micro-organismos, produção de substâncias tóxicas e maior tolerância antimicrobiana (Silva et al. ⁶⁹ 2010). Dessa maneira, a capacidade de produção de biofilme apresentada por *Candida spp*. está diretamente relacionada à virulência destes micro-organismos e à sua capacidade de causar infecções. Além disso, a presença de um biofilme tem grande relevância clínica nas infecções, pois, nesta forma de crescimento, os micro-organismos exibem propriedades fenotípicas distintas das células planctônicas e maior resistência aos agentes

antimicrobianos (Douglas et al. ⁶⁷ 2003). As espécies de *Candida spp*, particularmente *C. albicans*, quando testadas em modelos de biofilmes desenvolvidos em superfícies acrílicas, exibiram resistência aos antifúngicos nistatina e fluconazol (Lamfon et al. ⁷⁰ 2005), frequentemente utilizados no tratamento da candidose. Ainda, a presença de um biofilme na cavidade bucal favorece a disseminação dos micro-organismos, pois as células podem se desprender do biofilme, se dispersar nas secreções salivares, sendo aspiradas e disseminadas para outros locais do corpo, causando, assim, infecções sistêmicas, como a fungemia e a pneumonia aspirativa (Sumi et al. ⁷¹ 2002). A presença de biofilme sobre as próteses dentárias pode, ainda, causar a colonização persistente, levando ao aparecimento de infecções recorrentes (Neppelenbroek et al. ¹⁴ 2008). Todos os fatores acima mencionados reforçam a relevância de nossos resultados.

Em relação à citotoxicidade, os resultados mostraram que todos os extratos diminuíram a viabilidade celular dos queratinócitos orais normais (NOK) em comparação com o grupo controle. Quando os resultados foram convertidos em porcentagem e comparados com o grupo controle, verificou-se que os extratos na concentração do biofilme foram considerados intensamente citotóxico, em todos os tempos. Nas CIMs, os extratos variaram de não citotóxicos a intensamente citotóxico. Esses resultados estão de acordo com os reportados por Feng et al. ⁴⁵ (2013), os quais observaram que a espécie *Cryptocarya maclurei* possui alguns constituintes que possuem citotoxicidade moderada para células cancerígenas. Um desses compostos é a cryptomaclurona, que pode estar presente nos extratos utilizados no presente estudo, influenciando na viabilidade celular. Esses resultados colaboram com o estudo de Huang et al. ⁴⁷ (2014), que testaram a atividade antimicrobiana e citotoxicidade de flavonoides de *Cryptocarya concinna* e observaram que alguns compostos exibiram atividade citotóxica moderada. Da mesma forma, em 2018, Andrade et al. ⁴⁸, relataram que o óleo essencial das folhas de *Cryptocarya aschersoniana* apresentou alta toxicidade contra macrófagos peritoneais de camundongos, isso porque o óleo, o qual possui caráter apolar, penetra nas células e não age em receptores celulares específicos, causando morte celular por necrose e apoptose. O mecanismo de morte celular também pode incluir a geração de espécies reativas de oxigênio,

despolarização mitocondrial e dano ao DNA (Chang et al. ⁷² 2016). Embora comparações tenham sido feitas, somente um estudo cromatográfico poderia identificar os componentes tóxicos dos extratos utilizados no presente estudo.

As imagens obtidas a partir da microscopia de varredura confocal a laser estão de acordo com os resultados dos testes descritos acima. Embora a análise quantitativa tenha mostrado predominância de células vivas, houve grande diferença entre o grupo controle ($R = 10,8$) e os demais grupos: extrato 10 minutos ($R = 4,6$), extrato 20 min ($R = 2,2$), nistatina 10 min ($R = 2,1$) e nistatina 20 min ($R = 3,4$), mostrando diminuição do número de células nos grupos experimentais e no controle positivo.

Os resultados destes dois estudos iniciais nos trazem informações importantes a respeito da atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos de espécies de *Cryptocarya*. Porém, estudos in vivo são necessários, uma vez que os estudos in vitro apresentam uma série de limitações, como ser realizados em biofilme simples de *C. albicans* e a utilização de células em monocamadas, as quais são mais susceptíveis a danos externos. Assim, a terceira fase do presente estudo foi realizada em modelo in vivo, utilizando o extrato de folha de *C. moschata*.

O modelo experimental de candidose oral utilizado neste estudo se mostrou reproduzível uma vez que, onde a infecção foi induzida, porém nenhum tratamento foi realizado, os cortes histológicos revelaram presença de leveduras, hifas e pseudo-hifas na superfície dorsal da língua dos animais, estando de acordo com outros estudos (Takakura et al. ⁶¹ 2003; Mima et al. ⁶² 2010; Alves et al. ⁶³ 2018). Neste grupo, a candidose também foi verificada pela presença de um número significativo de UFC/mL de *C. albicans* coletadas no dorso da língua dos animais (10^6). Estes resultados estão de acordo com Takakura et al. ⁶¹ 2003, que observaram equivalente número de UFC/mL de *Candida* (10^5 - 10^6) recuperado de cada cavidade oral murina. Já nos grupos onde a infecção por *C. albicans* não foi induzida e nenhum tratamento foi realizado, os cortes histológicos evidenciaram uma mucosa lingual intacta e sadia, como era esperado.

Em relação à capacidade de invasão das células fúngicas, as imagens mostraram que no grupo onde a infecção foi induzida, porém nenhum tratamento foi realizado, as leveduras, hifas e pseudo-hifas se encontravam em meio a uma espessa camada de ceratina localizada na superfície dorsal da língua dos animais. O epitélio se apresentava contínuo, sem evidências de invasão de micro-organismos no seu interior, sendo que a camada basal estava íntegra. O tecido conjuntivo subjacente não exibia alterações estruturais, sendo que numerosos fibroblastos se localizavam dispersos em meio a delgada camada de matriz extracelular rica em colágeno. Nas áreas mais profundas da língua, o tecido muscular se apresentava íntegro, com numerosos feixes de fibras normalmente distribuídos, estando de acordo com estudo prévio (Mima et al.⁶² 2010).

Em relação à biocompatibilidade dos extratos, histologicamente, os resultados mostraram que não houve danos às células epiteliais após o uso terapêutico, diferentemente dos resultados de citotoxicidade em monocamada. Para os grupos onde a infecção com *C. albicans* não foi induzida nos animais, porém a mucosa lingual do dorso da língua dos camundongos recebeu solução de nistatina ou extrato de folha de *C. moschatta*, os cortes histológicos obtidos evidenciaram, tal como observado no grupo sem indução e sem tratamento, epitélio íntegro cujas projeções eram recobertas por ceratina (papilas filiformes). O tecido conjuntivo subjacente, bem como o tecido muscular superficial e profundo exibiram características histológicas de normalidade. Esses achados evidenciam a biocompatibilidade dos extratos, semelhante ao grupo tratado com nistatina, comumente utilizado no tratamento da estomatite protética. Em alguns cortes discreto infiltrado inflamatório mononuclear foi observado, associado com vasodilação pontual, no tecido conjuntivo imediatamente abaixo de algumas áreas delgadas do epitélio. Essa pequena inflamação provavelmente está relacionada à infecção por *C. albicans* e não ao tratamento, uma vez que essa condição foi verificada no grupo onde a infecção foi induzida, porém nenhum tratamento foi realizado. Esses resultados também estão de acordo com os reportados por Mima et al.⁶² (2010).

Os resultados de UFC/mL do biofilme coletado no dorso da língua dos animais mostraram que houve uma diminuição estatisticamente significativa em todos

os grupos experimentais com relação ao grupo controle, sendo que os grupos que receberam duas aplicações de nistatina ou duas aplicações do extrato tiveram o número de UFC/mL reduzido a zero. Também se observou que o extrato foi eficaz na redução do biofilme de *C. albicans*, com resultados semelhantes ao grupo tratado com nistatina, onde após uma aplicação, o número de UFC/mL foi reduzido em torno de 2 logs. Nos grupos onde a candidose da mucosa lingual foi induzida e o tratamento foi realizado por meio da administração imediata e reaplicação após 24 horas de solução de nistatina ou solução de extrato de folha de *C. moschatta* na CFMb (0,045 g/mL), os cortes histológicos revelaram o epitélio contínuo e íntegro, recoberto com uma delgada camada de ceratina livre de contaminação. Assim, os resultados obtidos a partir do modelo in vivo confirmam os achados encontrados no modelo in vitro e comprovam a eficácia dos extratos de espécies de *Cryptocarya* no controle do biofilme de *C. albicans*. Esses resultados podem ser considerados promissores em alcançar terapias naturais, não sintéticas e de baixo custo para o tratamento de infecções fúngicas, como a estomatite protética.

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. Cavaleiro 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, Cavaleiro 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, Cavaleiro 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, Cavaleiro 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, Cavaleiro 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. Telascrêa, 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*

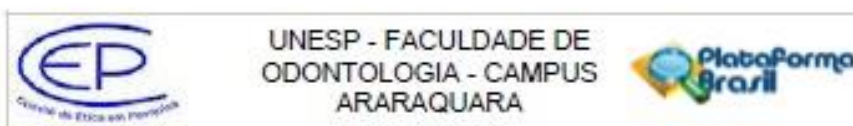
Nees (Lauraceae) [Tese de Doutorado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista,UNESP; 2001.

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: Paniarello B, Alves F, Carmello JC. Manual de protocolos do laboratorio de microbiología aplicada. Araraquara: Laboratorio de microbiologia aplicada da Faculdade de Odontología 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.

ANEXO A – PROTOCOLO CEP: CAAE 79249417.0.0000.5416



Continuação do Parecer: 2.407.591

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta grande relevância clínica e para o tratamento de infecções fúngicas orais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

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_1014683.pdf	12/12/2017 14:08:25		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimento.doc	21/11/2017 10:25:47	Janaina Habib Jorge	Acelto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	21/11/2017 10:24:16	Janaina Habib Jorge	Acelto
Orçamento	orcamentodetalhadodapesquisa.pdf	19/10/2017 13:18:24	Janaina Habib Jorge	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocriptocarya.docx	19/10/2017 13:17:03	Janaina Habib Jorge	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	acelitelaboratorio.pdf	18/10/2017 09:08:36	Janaina Habib Jorge	Acelto
Declaração de Pesquisadores	termodecompromisso.doc	18/10/2017 09:08:16	Janaina Habib Jorge	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Endereço: HUMAITÁ 1580
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 E-mail: cep@foc.unesp.br

ANEXO B - PROTOCOLO CEUA: 36/2017

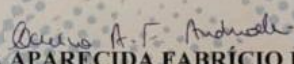


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada ***"EFICÁCIA DOS EXTRATOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE CRYPTOCARYA (LAURACEAE) SOBRE BIOFILME DE CANDIDA ALBICANS E BIOCOMPATIBILIDADE: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO"***, registrada com o nº 36/2017, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Janaina Habib Jorge**– que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 28/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Janeiro/2021
Espécie/linhagem	Camundongo – Swiss mice
Nº de animais	50
Peso/Idade	35-40 g – 6 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho até 06 de agosto de 2023

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 06 de agosto de 2021

Jacqueline de Oliveira Zoccolotti