



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



**Jonatas Silva de Oliveira**

**Efeitos das frações do extrato de *Cryptocarya moschata* sobre células  
planctônicas e biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Streptococcus*  
*mutans***

**Araraquara**

**2024**



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



**Jonatas Silva de Oliveira**

**Efeitos das frações do extrato de *Cryptocarya moschata* sobre células  
planctônicas e biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Streptococcus*  
*mutans***

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Habib Jorge**

**Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro**

**Araraquara**

**2024**

O48e	<p>Oliveira, Jonatas Silva de</p> <p>Efeitos das frações do extrato de <i>Cryptocarya moschata</i> sobre células planctônicas e biofilmes simples e misto de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i> / Jonatas Silva de Oliveira. -- Araraquara, 2024</p> <p>63 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara</p> <p>Orientadora: Janaina Habib Jorge</p> <p>Coorientador: Alberto José Cavalheiro</p> <p>1. <i>Cryptocarya</i>. 2. <i>Candida albicans</i>. 3. <i>Streptococcus mutans</i>. 4. Biofilmes. 5. Matriz extracelular de substâncias poliméricas. I. Título.</p>
------	--

**Jonatas Silva de Oliveira**

**Efeitos das frações do extrato de *Cryptocarya moschata* sobre células planctônicas e biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans***

**Comissão Julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia**

**Presidente e Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Habib Jorge

**2° Examinador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Pero

**3° Examinador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Cabral dos Santos Accioly Lins

Araraquara, 26 de fevereiro de 2024.

## **Jonatas Silva de Oliveira**

NASCIMENTO: 19/09/1997 – Recife – Pernambuco.

FILIAÇÃO: Glais Bezerra da Silva

Antônio Paulo Tranquilino de Oliveira

2016-2022

Curso: Graduação em Odontologia

Local: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Recife, Pernambuco, Brasil.

2022

Curso: Mestrado em andamento em Odontologia na área de  
Reabilitação Oral

Local: Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)

Araraquara, São Paulo, Brasil.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Habib Jorge

Dedico esta dissertação a minha avó, Josefa Beserra, por ser minha maior incentivadora, por todo amor e cuidado. Obrigado por toda luta para eu ter chegado aqui.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é a realização de mais um sonho que foi idealizado desde minha graduação, sonho de um estudante de Recife em cursar o mestrado em São Paulo, tão longe de casa, trouxe muitos desafios que foram perpassados até aqui.

Primeiramente, agradeço à minha avó, **Josefa Beserra**, a qual dedico essa dissertação. Obrigado por nunca me abandonar e sempre ser o meu maior exemplo de superação e luta. À minha mãe, **Glais Bezerra**, por ser meu porto seguro tão longe, por cuidar de mim e do meu irmão, por todo amor proporcionado e pela força até hoje.

À minha orientadora, **Janaina Habib Jorge**, por ter aceitado me orientar sem ao menos me conhecer, por me fazer crescer profissionalmente, por me acolher quando tive dúvidas, quando tive saudade, e por ser uma pessoa incrível que cuida dos seus alunos. Você é uma fonte de inspiração que levarei para sempre. Obrigado por todas as oportunidades até aqui e espero que continuemos juntos durante essa caminhada acadêmica.

A **Felipe Mosquetta**, meu namorado e companheiro, por todo amor, todo apoio e ajuda durante essa jornada do mestrado. Obrigado por ter sido porto seguro em tantos momentos, obrigado por enxugar minhas lágrimas e dizer que daria certo, obrigado por ter me dado caminhos quando eu achei que não conseguiria. Obrigado por ter me dado uma família em Araraquara. Você é luz, presença e companheirismo.

A **Mariana Torres e Renata Flores** por serem as melhores amigas que eu poderia ter. Mesmo com a distância, posso dizer que o amor, a admiração e o carinho continuam os mesmos. Vocês são a minha maior saudade e tenho certeza de que ainda vamos estar os três juntos para comemorar todas as conquistas que tivemos desde o Ensino Médio.

A **Brenda Luhana** pelas conversas diárias, por ser amor, carinho, partilhar e trilhar esse sonho comigo. Por nunca ter soltado a minha mão, por ter ouvido tantos choros e risos dessa jornada até aqui. Mesmo longe fisicamente, estamos sempre juntos em pensamento e no coração.

A **Amanda Ferro e Beatriz Ribas** por toda amizade, conversas, pelo acolhimento em uma universidade que eu não conhecia nada, por toda ajuda e por trilharem esse caminho comigo. Obrigado por todos os momentos, festas, jantares e viagens. Sou imensamente grato por todas as histórias que criamos juntos.

A **Joingle Viotto**, **Hamille Viotto** e **Gabriel Nogueira** por todos os cafés compartilhados, todas as conversas em momentos difíceis, por sempre estarem juntos em qualquer momento. Vocês são um presente que a FOAr me deu. Agradeço demais a cada um de vocês.

A **Camila Tasso** e **Rafaelly Camargo** por toda ajuda no laboratório, por sempre estarem presentes quando eu pedia ajuda. Camila foi uma professora para mim dentro da Unesp me ensinando o dia a dia do laboratório, obrigado por ter sido tão solícita e alegre em todos os momentos compartilhados comigo. Rafaelly, minha primeira aluna de iniciação científica, agradeço por sempre ter se mostrado disponível quando eu precisava de ajuda, espero que eu tenha deixado alguma marca na sua vida profissional.

A **Bruno Manoel**, **Cleiton Rone** e **Jailton Silva** por toda amizade, todas as conversas, por serem meus amigos mesmo tão longe, vocês sempre terão um lugar no meu coração. Não importa onde eu esteja, sempre lembrarei de vocês.

A **Andreza Anjos** e **Stella Santos** por conversas tão profundas, por sempre me quererem perto e por todos os momentos compartilhados. Suas vozes ecoam dentro de mim quando mais preciso. Sei que estamos juntos nessa estrada e sou muito feliz por isso.

A **Giovanna Bione**, **Larissa França**, **Calina Raíssa** e **Fátima Eduardda** por serem companheiras desde a faculdade, sempre emanarem força quando o outro precisa e por serem sempre ajuda em momentos difíceis e alegria em momentos bons.

A **Ana Luíza**, **Gabriel Nogueira**, **Jailson Junior**, **João Queiroz** e **Victória Peruchi** por serem uma turma de mestrado excelente. Sou grato por toda ajuda em momentos de dúvidas, de sempre estarem presentes quando um de nós precisava. Estou muito orgulhoso do caminho que traçamos até aqui.

À banca examinadora do exame de qualificação, Prof. Dr. **Gelson Luis Adabo** e Prof. Dr. **José Maurício dos Santos Nunes Reis**, que compartilharam seu conhecimento comigo e enriqueceram esse trabalho na sua versão final.

À banca examinadora do exame de defesa de mestrado, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ana Carolina Pero** e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Carla Cabral dos Santos Accioly Lins** por terem aceitado o convite para compor a banca da defesa. Admiro a história acadêmica das duas e fico imensamente feliz por elas poderem acrescentar seus conhecimentos neste trabalho.

À toda equipe de professores, alunos, técnicos da FOAr/UNESP por ajudarem e contribuírem com meu conhecimento para a realização desse trabalho.

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.

Agradeço também a todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho.

Oliveira JS. Efeitos das frações do extrato de *Cryptocarya moschata* sobre células planctônicas e biofilmes simples e misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de frações de *Cryptocarya moschata* sobre células planctônicas e biofilmes de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Inicialmente, foram produzidos extratos de *C. moschata* que posteriormente foram fracionados pelo método de extração líquido-líquido. Foram preparadas quatro frações: solução de Hexano a 100% (Hex), Acetato/Hexano 1:1 (AcOEt/Hex), Acetato de Etila a 100% (AcOEt) e Água (H<sub>2</sub>O). O efeito das frações de *C. moschata* foi avaliado nas células planctônicas por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Frações e concentrações efetivas foram utilizadas para ensaios de biofilme. Foram realizados os seguintes testes em biofilme: contagem de unidades formadoras de colônias (n=10), avaliação do metabolismo celular pelo teste AlamarBlue (n=10) e análise qualitativa por microscopia confocal de varredura a laser (n=2). A análise estatística das variáveis foi feita pelo teste estatístico U de Mann-Whitney ao nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que as frações apresentaram constituintes lipofílicos, estirilpironas, principalmente a goniotalamina, flavonoides glicosados e alcaloides. A fração AcOEt/Hex nas concentrações de 100% e 50% (p<0,05) e a fração AcOEt a 100% (p<0,05) tiveram efeito redutor das células planctônicas de *C. albicans*, tendo sido estatisticamente diferentes das outras frações. No entanto, as frações de *C. moschata* não tiveram efeito nas células planctônicas de *S. mutans*. Em relação ao biofilme, as frações foram capazes de reduzir o número de UFC/mL tanto para biofilmes simples quanto para o misto. Os resultados também mostraram que houve redução do metabolismo celular do biofilme de *C. albicans* após tratamento com as frações. Além disso, as frações causaram danos à matriz extracelular dos biofilmes. Concluiu-se que as frações de *C. moschata* apresentaram efeito antimicrobiano contra biofilme simples de *C. albicans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans*.

**Palavras – chave:** *Cryptocarya*. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*. Biofilmes. Matriz extracelular de substâncias poliméricas.

Oliveira JS. Effects of *Cryptocarya moschata* fractions on planktonic cells and simple and dual species biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of fractions of *Cryptocarya moschata* on planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Initially, *C. moschata* extracts were produced and then fractionated using the liquid-liquid extraction method. Four fractions were prepared: 100% Hexane solution (Hex), Acetate/Hexane 1:1 (AcOEt/Hex), 100% Ethyl Acetate (AcOEt) and Water (H<sub>2</sub>O). In the first, the effect of *C. moschata* fractions was evaluated on planktonic cells by counting of colony-forming units (CFU/mL). Effective fractions and concentrations were used for biofilm assays. The following tests were performed to biofilm: counting of colony-forming units (n=10), evaluation of cellular metabolism using the Alamar Blue test (n=10) and qualitative analysis by confocal laser scanning microscopy (n=2). The statistical analysis of the variables was performed using the Mann-Whitney U test at a significance level of 5%. The results showed that the fractions exhibited lipophilic constituents, styrylpyrones, mainly goniotalamine, glycosylated flavonoids, and alkaloids. The AcOEt/Hex fraction at concentrations of 100% and 50% (p<0.05) and Ac fraction at 100% (p<0.05) had a reducing effect on planktonic cells of *C. albicans*, which were statistically different from the other fractions. However, the *C. moschata* fractions had no effect on *S. mutans* planktonic cells. In relation to biofilm, the fractions were able to reduce the number of CFU/mL for both, simple and dual species biofilms. The results also showed that there was a reduction in the cellular metabolism of the *C. albicans* biofilm after treatment with the fractions. Furthermore, the fractions caused damage to the extracellular matrix of biofilms. It was concluded that *C. moschata* fractions have an antimicrobial effect against simple biofilm of *C. albicans* and dual species of *C. albicans* and *S. mutans*.

**Keywords:** *Cryptocarya*. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*. Biofilms. Extracellular polymeric substance matrix.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1 Coleta e Preparo do Extrato Vegetal</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2 Fracionamento dos Extratos Brutos de <i>C. moschata</i></b> .....	<b>21</b>
<b>4.3 Caracterização Química das Frações da Folha de <i>C. moschata</i></b> .....	<b>22</b>
<b>4.4 Micro-organismos e Condições de Crescimento</b> .....	<b>23</b>
<b>4.5 Preparo das Frações da Folha de <i>C. moschata</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.6 Concentração Inibitória Mínima das Frações de <i>C. moschata</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.7 Grupos Experimentais para Avaliação da Atividade Antimicrobiana em Células Planctônicas</b> .....	<b>25</b>
<b>4.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Frações de <i>C. moschata</i> em Células Planctônicas</b> .....	<b>25</b>
<b>4.9 Grupos Experimentais para Avaliação das Frações de <i>C. moschata</i> sobre Biofilmes Simples e Misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i></b> .....	<b>26</b>
<b>4.10 Avaliação das Frações de <i>C. moschata</i> sobre Biofilmes Simples de <i>C. albicans</i> e Misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i></b> .....	<b>27</b>
<b>4.10.1 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL)</b> .....	<b>28</b>
<b>4.10.2 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®</b> .....	<b>28</b>
<b>4.10.3 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal</b> .....	<b>29</b>
<b>4.10.4 Avaliação dos componentes proteicos da matrix do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal</b> .....	<b>29</b>
<b>4.11 Análise Estatística</b> .....	<b>30</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1 Caracterização Química das Frações da Folha de <i>C. moschata</i></b> .....	<b>31</b>

<b>5.2 Concentração Inibitória Mínima das Frações da Folha de</b>	
<b><i>C. moschata</i></b> .....	<b>33</b>
<b>5.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Frações de <i>C. moschata</i> em</b>	
<b>Células Planctônicas</b> .....	<b>35</b>
<b>5.4 Concentrações das Frações de <i>C. moschata</i> Utilizadas para Análise em</b>	
<b>Biofilmes Simples de <i>C. albicans</i> e Misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i></b> .....	<b>36</b>
<b>5.5 Avaliação das Frações de <i>C. moschata</i> sobre Biofilmes Simples de <i>C.</i></b>	
<b><i>albicans</i> e Misto de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i></b> .....	<b>36</b>
<b>5.5.1 Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL)</b> .....	<b>37</b>
<b>5.5.2 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®</b> .....	<b>40</b>
<b>5.5.3 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de</b>	
<b>Fluorescência Confocal</b> .....	<b>43</b>
<b>5.5.4 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de</b>	
<b>Microscopia de Fluorescência Confocal</b> .....	<b>45</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma doença inflamatória que, normalmente, se apresenta no palato duro dos usuários de próteses removíveis. Ela pode se apresentar como uma inflamação simples e localizada ou generalizada e granular (associada a uma hiperplasia granular) dos tecidos de base. Acomete de 11% a 67% de pessoas que usam prótese dentária, tendo maior prevalência em mulheres<sup>1,2</sup>.

A etiologia da EP é considerada multifatorial, variável e complexa. O uso de próteses dentárias, presença de biofilme microbiano, xerostomia e má higienização corroboram para a predominância dessa patologia<sup>3-7</sup>. A adesão de micro-organismos, principalmente as espécies de *Candida*, na superfície interna das bases de próteses e posterior formação de biofilme são fatores primordiais para o aparecimento da doença<sup>8</sup>.

A face interna da prótese é considerada um facilitador para a adesão e multiplicação de micro-organismos nas superfícies e a interface entre a prótese e a mucosa proporciona um ambiente único, que favorece a colonização e invasão tecidual devido às condições relativamente anaeróbias e ácidas<sup>9,10</sup>.

O tratamento mais comumente recomendado para a EP tem sido a utilização de medicamentos antifúngicos, os quais podem ser de aplicação tópica ou sistêmica, orientação do paciente quanto à higienização e verificação da necessidade da troca da prótese<sup>11,12</sup>. O aumento expressivo no uso de antifúngicos, aliado a diversos mecanismos intrínsecos, contribui para o desenvolvimento de novas cepas resistentes a esses medicamentos. Assim, a utilização de terapias antifúngicas precisa ser limitada devido à toxicidade, às taxas relativamente baixas de eficácia e à propensão para o surgimento de resistência fúngica<sup>13</sup>. Nesse contexto, a fitoterapia pode ser considerada uma opção promissora para atingir esse objetivo. Extratos de partes das plantas, suas frações e óleos essenciais vêm sendo estudados para descobrir seus potenciais antimicrobianos, principalmente contra *Candida albicans*<sup>14-16</sup>.

A família Lauraceae possui muitos gêneros e espécies, muitos deles já foram estudados devido a sua estrutura química e à presença de alcaloides, podendo ter resultados promissores na atividade antimicrobiana<sup>17,18</sup>. Wang et al.<sup>19</sup> afirmaram que o gênero *Cinnamomum* advindo da família Lauraceae, possui propriedades antimicrobianas, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, antidiabético,

imunorreguladora, protetor cardiovascular, bem como propriedades neuroprotetoras. Dentro de seus constituintes químicos têm-se 111 terpenos, 44 fenilpropanoides, 51 lignanas, 17 flavonoides, 53 compostos aromáticos, 17 alifáticos, quatro cumarinas e dois esteróides. O gênero *Cryptocarya* possui vários desses alcaloides e algumas espécies têm atividade antiproliferativa contra alguns micro-organismos<sup>17</sup>. Desde 1950, a *Cryptocarya spp* é estudada e existem 390 metabólitos conhecidos. As principais classes de compostos isolados foram os alcaloides,  $\alpha$ -pironas e flavonoides<sup>20</sup>. As espécies *Cryptocarya mandiocanna* e *Cryptocarya moschata* são as mais encontradas no Brasil. Estudos prévios mostraram que o extrato de *C. moschata* possui atividade antifúngica contra *C. albicans in vivo* e *in vitro*<sup>21,22</sup>, tendo grande potencial como agente terapêutico.

A diversidade das plantas, influenciada pelo ambiente, destaca a importância do estudo das suas frações. O fracionamento e purificação dos princípios ativos são realizados para otimizar suas potências, mas alguns processos podem ampliar ou reduzir o espectro de ação antimicrobiana, dependendo da interação das moléculas nos extratos<sup>23,24</sup>. Por isso, se faz necessário o estudo com as frações de plantas para investigar quais moléculas podem estar presentes e quais podem ser usadas para a criação de novos fármacos<sup>23</sup>. Não foram encontradas pesquisas na literatura sobre as frações de *C. moschata*. Por isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana das frações de *C. moschata*, após fracionamento dos extratos brutos, sobre células planctônicas e biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*. As hipóteses nulas foram: A - Frações da folha de *C. moschata* não teriam efeito antimicrobiano sobre as células planctônicas de *C. albicans* e *S. mutans*; B - Frações da folha de *C. moschata* não teriam efeito sobre biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das frações do extrato da folha de *C. moschata* sobre células planctônicas e biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*.

### 2.1 Objetivos Específicos

- a) Realizar a caracterização química das frações do extrato da folha de *C. moschata* para investigar quais princípios ativos podem estar envolvidos na atividade antimicrobiana da planta;
- b) Avaliar quais frações do extrato da folha de *C. moschata* possuem eficácia na inativação de células planctônicas de *C. albicans* e *S. mutans*;
- c) Avaliar quais frações do extrato da folha de *C. moschata* possuem eficácia na inativação de biofilmes simples e misto de *C. albicans* e *S. mutans*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

O uso de próteses dentárias removíveis, como próteses parciais ou totais, causa modificação na cavidade oral, favorecendo a colonização de fungos e bactérias. Esse fato pode ocasionar a transformação reversível da levedura de *C. albicans* em hifa, aumentando sua patogenicidade. Essa transformação pode ser influenciada pelo pH, temperatura, alimentação e níveis de açúcar<sup>25</sup>. A proliferação dos micro-organismos resulta na formação de biofilme, que é um dos principais fatores para o desenvolvimento da EP<sup>26</sup>.

Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturadas, ligadas a uma superfície e envoltas em uma matriz de material exopolimérico autoproduzido. A mudança do crescimento das células planctônicas (de vida livre) para o biofilme pode ocorrer por variações ambientais e envolve múltiplas redes regulatórias, as quais controlam a expressão gênica, levando à reorganização espacial e temporal da célula microbiana. A partir do momento em que o biofilme está formado é difícil diminuir a quantidade de células, devido a maior resistência à terapia antifúngica e a capacidade das células dentro dos biofilmes em resistirem as defesas imunológicas do hospedeiro<sup>27</sup>.

O biofilme formado em próteses dentárias é considerado complexo e observa-se a colonização em massa de diversos micro-organismos, como bactérias Gram-positivas, dentre as quais *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. anginosus*, *Staphylococci*, e bastonetes como *Actinomyces* e *Lactobacillus*. Além disso, espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, são predominantes nesses biofilmes, interagindo através de carboidratos e proteínas<sup>12,28</sup>.

*C. albicans* é mais encontrada na forma de levedura ou filamentosa, mas consegue transitar entre as duas formas. A transformação das leveduras em hifas tem papel fundamental na virulência do fungo, sendo correlacionada com sua patogenicidade<sup>29</sup>. O biofilme de *C. albicans* possui uma estrutura complexa e é composto por células em diferentes morfologias (células redondas em forma de levedura em brotamento, células pseudo-hifas ovais e células hifais cilíndricas alongadas) envoltas em matriz extracelular<sup>30,31</sup>. Um fator primordial para o desenvolvimento da EP é a presença do biofilme de *C. albicans*, em associação com outros fatores como tabagismo, doenças imunossupressoras, fatores demográficos, falta de higienização e uso contínuo da prótese dentária. Em uma revisão sistemática

da literatura e meta-análise foi analisado que a prevalência de *C. albicans* entre pacientes com EP era de 60,3%<sup>32</sup>.

Sabendo da complexidade do biofilme, é necessário entender que existem outros micro-organismos que interagem com *C. albicans* para aumentar a sua patogenicidade. *S. mutans* é uma bactéria que vive, principalmente, nos biofilmes sobre os dentes, sendo um dos agentes etiológicos da cárie dentária. Esse micro-organismo se adere no dente através de outras espécies como *S. gordonii*, *S. oralis* e *S. mitis* e produz enzimas extracelulares que polimerizam a porção da glicose em um grupo heterogêneo de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis em água. Com isso, há formação da matriz polimérica limitadora de difusão que protege as bactérias incorporadas. Somado a isso, *S. mutans* ainda possui uma tolerância ao estresse que permite sua sobrevivência e adaptação a mudanças ambientais repentinas<sup>33-35</sup>.

*S. mutans* possui a habilidade de aumentar sinergicamente a formação e a virulência de biofilmes mistos com *C. albicans*, resultando em lesões cariosas mais graves<sup>36</sup>. Isso sugere que a presença de *S. mutans* em um biofilme formado em próteses dentárias pode agravar a sintomatologia da EP<sup>37</sup>. Estudos revelam que as vesículas da membrana de *S. mutans* contendo glucosiltransferases aumentam a formação do biofilme de *C. albicans*, aumentando a produção de exopolissacarídeos, que podem aumentar a patogenicidade do fungo com aumento da expressão de proteínas e metabólitos de *C. albicans*<sup>38,39</sup>. Sampaio et al.<sup>40</sup>, em uma revisão sistemática e meta-análise, observaram contagens mais altas de *S. mutans* em biofilmes localizados na mucosa e na prótese dentária de usuários com EP, afirmando que bactérias orais possuem um papel relevante na manutenção e virulência de biofilmes causadores de EP.

A EP é uma doença mediada pelo biofilme que causa inflamação e lesão celular na região de palato duro, que pode apresentar sensação de queimação, disfagia, xerostomia, e sangramento nas mucosas<sup>41,42</sup>. Ela é considerada de etiologia multifatorial e está ligada a presença de *C. albicans* na mucosa palatina, na superfície interna da prótese e no sangue dos pacientes diagnosticados com a doença<sup>43</sup>. Além da presença de biofilme, má higiene da prótese, a alimentação dos pacientes e a mudança da microbiota pela falta de dentes influenciam no desenvolvimento dessa patologia. A imunossupressão ou doenças sistêmicas podem ser fatores predisponentes para o desenvolvimento da EP quando o paciente faz uso de prótese

dentária. A EP sem tratamento pode levar a casos mais graves como pneumonia ou uma infecção sistêmica<sup>44-46</sup>.

A classificação de Newton, criada em 1962, sofreu modificações e atualmente a EP apresenta três tipos com suas subdivisões. O tipo 0 é considerado a mucosa saudável e o tipo I é dividido em dois: IA: petéquias em tecido palatino normal, geralmente encontradas ao redor dos orifícios dos ductos das glândulas mucosas palatinas e IB: área de inflamação localizada na área de suporte da prótese; tipo II: área de inflamação generalizada na área de suporte da prótese; e tipo III: superfície palatina hiperplásica com inflamação na área de suporte da prótese<sup>47</sup>.

Levando em consideração que a EP é uma doença que possui alta prevalência de fungos, a terapia mais utilizada são os medicamentos antifúngicos, que podem ser tópicos (bochechos ou pomadas) ou sistêmicos. É necessária orientação de higiene do paciente e verificação da qualidade da prótese dentária para possível troca<sup>48</sup>. A terapia mais empregada é o uso de Nistatina, derivada dos poliênicos B que modificam a permeabilidade da membrana celular dos fungos. Os derivados da classe dos azóis como Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol e Miconazol agem bloqueando a síntese de ergosterol da parede celular dos fungos, também são indicados para quadros graves de EP<sup>49</sup>.

Em uma meta-análise comparando a eficácia de antifúngicos com métodos alternativos, como agentes desinfetantes, enxaguatórios bucais antissépticos, substâncias naturais com propriedades antimicrobianas, desinfecção por micro-ondas e terapia fotodinâmica, foi visto que os métodos de desinfecção e antissépticos podem ser tão eficazes quanto a terapia antifúngica<sup>50</sup>. Dessa forma, é importante ter cuidado na utilização de antifúngicos de forma excessiva devido aos efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, hipersensibilidade, toxicidade renal e hepática e interação com outros medicamentos. Além disso, pode-se desenvolver resistência medicamentosa, fazendo com que haja uma diminuição da ação desse medicamento e recidivas da doença<sup>50</sup>.

Desde 2006 que não há novos agentes antifúngicos relacionados a produtos naturais e todos os medicamentos são baseados na química dos azóis e dos poliênicos B<sup>51</sup>. Em contrapartida, novos fungos vêm sendo descobertos, além do aumento da resistência a medicamentos, como a presença de *C. auris* após tratamento com fluconazol e a anfotericina B em cerca de 30% dos isolados clínicos. Diante disso, os produtos naturais ainda são a melhor opção para encontrar novos

modelos/agentes ativos que, associados a tratamentos já existentes, podem oferecer potenciais resoluções a uma variedade de doenças<sup>51</sup>.

A utilização de fitoterápicos é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978 através da Declaração de Alma-Ata com o intuito de promover saúde com diretrizes preventivas, curativas e com fins diagnósticos. Isso porque 80% da população faz uso de plantas e no Brasil há um grande potencial a ser explorado devido a ampla biodiversidade vegetal que pode ser usada em associação à tecnologia para validação da sua efetividade. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, criada pelo Ministério da Saúde em 2005, é importante para difundir esse conhecimento, além de poder implementar protocolos de saúde no Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>52</sup>.

Já é visto uma quantidade considerável de pesquisas com plantas em doenças da cavidade bucal, como extrato da framboesa vermelha (*Rubus idaeus*), que possui atividade anti-adesão do biofilme de *C. albicans*<sup>53</sup>, e própolis e óleos essenciais, que são fontes promissoras de agentes antimicrobianos<sup>54</sup>. Em uma revisão da literatura foi investigado a ação antifúngica de fitoterápicos contra a *C. albicans* e os resultados mostraram que o alho, chá verde, própolis, curcumina, raiz de alcaçuz, canela e gengibre tem ações eficazes contra o fungo mais predominante da EP. Sendo considerado uma opção de baixo custo e sem efeitos colaterais comparados aos tratamentos convencionais<sup>55</sup>.

Em uma revisão sistemática de ensaios clínicos para identificar se géis formulados com substâncias antimicrobianas advindas de produtos naturais são mais eficazes que os medicamentos antifúngicos, observou-se que os géis de óleo essencial de *Zataria multiflora* e extratos de cravo e canela apresentaram maior eficácia antimicrobiana em comparação com miconazol e clotrimazol. As formulações contendo *Uncaria tomentosa*, *Punica granatum* e extrato de própolis apresentaram eficácia semelhante à nistatina e ao miconazol<sup>56</sup>. Géis de *Z. multiflora* e miconazol induziram efeitos adversos, incluindo queimação, coceira, náusea e vômito. Os estudos incluídos não avaliaram a biocompatibilidade dos géis, considerado como uma limitação do estudo. Concluiu-se que formulações advindas de plantas podem ser utilizadas com uma eficácia maior ou semelhante aos medicamentos antifúngicos<sup>56</sup>.

A família Lauraceae destaca-se pela sua ampla distribuição, englobando 52 gêneros e aproximadamente 3000 espécies, principalmente representadas por

árvores e arbustos<sup>57</sup>. No contexto brasileiro, esse conjunto desempenha um papel significativo, com cerca de 439 espécies presentes no país, enriquecendo a diversidade da Mata Atlântica, Cerrado e Floresta Amazônica<sup>58</sup>. Dentro da Lauraceae, o gênero *Cryptocarya* se destaca como um dos maiores, compreendendo aproximadamente 350 espécies, das quais 11 são encontradas no Brasil. Especificamente, oito dessas espécies são encontradas na Mata Atlântica, evidenciando a importância desse ambiente para a biodiversidade desse gênero. Essas espécies incluem: *C. aschersoniana*, *C. granulata*, *C. jacarepaguenses*, *C. micrantha*, *C. mínima*, *C. moschata*, *C. saligna* e *C. mandiocana*<sup>58,59</sup>. Diversos produtos naturais, caracterizados por uma notável diversidade estrutural, foram isolados de espécies desse gênero, incluindo flavonoides, alcaloides e pironas<sup>17,60</sup>.

Várias espécies de *Cryptocarya* spp foram estudadas com foco em sua fitoquímica e farmacologia<sup>61-64</sup>. Estudos prévios observaram atividade antifúngica de *C. moschata* e *C. mandiocana*<sup>65,66</sup>. Extratos brutos de folhas e caules da *C. moschata* demonstraram atividade antiproliferativa. Zocolotti et al.<sup>21</sup> avaliaram a eficácia dos extratos de *Cryptocarya* spp em biofilme de *C. albicans* formado sobre resinas acrílicas para base de próteses. Os autores verificaram inibição completa do biofilme com a utilização do extrato da folha e do fruto de *C. moschata* e *C. mandiocana*. Ainda, em 2022, Zocolotti et al.<sup>22</sup>, em estudo *in vivo*, observaram que, histologicamente, o extrato de *C. moschata* não causou danos celulares na língua dos camundongos e houve diminuição do biofilme de *C. albicans*, semelhante ao grupo tratado com Nistatina, usado como controle positivo.

As plantas são diversificadas de acordo com o local de crescimento, habitat, animais ao redor e, levando isso em consideração, é importante estudar as frações de produtos naturais. Isso porque acredita-se que o fracionamento e purificação dos princípios ativos otimizariam suas potências. Entretanto, o processo de fracionamento pode reduzir sua ação devido as moléculas que podem agir de forma sinérgica<sup>23,24</sup>.

É promissora a utilização da fitoterapia para tratamento de diversas doenças bucais, mas pesquisas que testem sua eficácia, segurança e benefícios terapêuticos são de suma importância. Além disso, pesquisas *in vitro* e *in vivo* com padronização das amostras fitoterápicas são relevantes para implementação dessa terapia, facilitando e proporcionando o tratamento de diferentes doenças<sup>55,67</sup>.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia deste trabalho foi desenvolvida no Instituto de Química (IQ-Unesp) e no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-Unesp).

### 4.1 Coleta e Preparo do Extrato 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 das frações do extrato da folha de *C. moschata*. A autorização para a coleta do material vegetal foi concedida pelo Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA010.111/2018) e a permissão de acesso ao patrimônio genético brasileiro pelo SISGEN (A375D64). A coleta da *C. moschata* foi realizada na mata do Viveiro Camará, município de Ibaté – SP. O local foi selecionado pelo Dr. Alberto Cavalheiro, professor aposentado do Instituto de Química (IQ/UNESP), e pelos resultados de estudos anteriores<sup>21,22</sup>. Foi coletado 1,0 kg de folhas de *C. moschata*. As amostras 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<sup>63</sup>. Os extratos vegetais foram preparados por sonicação (UAE – extração assistida por ultrassom) do material vegetal com solvente hidroalcológico (água e etanol). Foram realizadas três extrações com o solvente por sonicação, durante 20 minutos cada, a fim de obter extratos, utilizando a proporção de 1:10 (p/v) de matéria-prima para solvente. Depois, o extrato foi filtrado e concentrado com eliminação do solvente por liofilização. Os extratos brutos foram pesados e aliqüotados para posteriormente serem diluídos em etanol nas proporções de interesse<sup>21,63</sup>.

### 4.2 Fracionamento dos Extratos Brutos de *C. moschata*

O fracionamento dos extratos brutos foi realizado pelo método de extração denominado Extração Líquido-Líquido (ELL), que consiste na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa)<sup>68</sup>. Este é um procedimento no qual ocorre a transferência de massa do soluto de um solvente inicial para um outro solvente conhecido como solvente de extração<sup>69</sup>. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração. A segregação dos componentes acontece durante o equilíbrio de fases, uma vez que o solvente extrator é adicionado

e agitado à mistura líquida inicial. Isso ocorre devido às discrepâncias de densidade e solubilidade entre as substâncias a serem separadas. A ELL é essencialmente constituída por três elementos: solvente, soluto e solvente extrator<sup>70</sup>.

Foi utilizado um funil de separação para adição dos solventes de extração com uma ampla faixa de solubilidade e seletividade<sup>68</sup>. Foram diluídos 10 g do extrato de *C. moschata* em etanol 70% (ETOH – solvente). Após a completa diluição e homogeneização do extrato, foram utilizados os seguintes solventes de extração em sequência: solução de Hexano 100% (Hex), Acetato/Hexano 1:1 (AcOEt/Hex), Acetato de etila 100% (AcOEt) e Água (H<sub>2</sub>O). O hexano é um hidrocarboneto considerado como apolar e o acetato de etila é um éster polar. Após a adição de cada solvente de extração duas fases são obtidas com um certo grau de separação, a fase orgânica, que conterà o solvente extrator e as moléculas que possuem afinidade, e a fase aquosa, que contém um pouco do solvente extrator e as moléculas sem afinidade. Adicionou-se cada solvente extrator três vezes e a fase orgânica ficou localizada na porção superior do funil, sendo a solução de interesse.

Retirou-se a porção mais próxima do bico do funil até a margem de separação. Em seguida, a solução resultante de cada solvente de extração foi filtrada e transferida para um balão, o qual foi conectado a um rotaevaporador para evaporação do solvente extrator e deposição das moléculas no fundo do balão. Esse resíduo da solução foi transferido para frascos de vidros e colocados em concentrador de amostras (modelo Speed Vac SPD, Thermo Scientific) para obtenção das frações secas. Nesta pesquisa, os grupos de tratamento foram denominados segundo o solvente extrator utilizado, com isso, obteve-se quatro frações: Hexano 100% (Hex), Acetato/Hexano 1:1 (AcOEt/Hex), Acetato de etila 100% (AcOEt) e Água (H<sub>2</sub>O).

#### **4.3 Caracterização Química das Frações da Folha de *C. moschata***

A caracterização química das frações da folha de *C. moschata* foi feita por meio de cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por meio de espectrometria de massas de alta eficiência (HPLC-DAD), com o propósito de investigar as substâncias contidas em cada fração. As frações foram analisadas por HPLC-DAD, sendo que a identificação dos principais constituintes foi realizada a partir dos espectros no UV obtidos para cada pico cromatográfico. Condições utilizadas: coluna Phenomenex Synergy 4 µm Hydro-RP 80A (150 mm x 4,6 mm), eluição no modo gradiente usando água (A) e etanol (B), ambos com 0,1% ácido fórmico:

05/60/100/100 % B em 0/20/30/35 minutos. Temperatura: 55 °C e vazão 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Espectros no UV obtidos na faixa de 200 a 600 nm.

#### 4.4 Micro-organismos e Condições de Crescimento

As cepas de *C. albicans* (ATCC® 90028) e *S. mutans* (UA159), estavam armazenadas em freezer -80°C. Previamente aos experimentos, as cepas foram descongeladas e semeadas com alça descartável estéril individualmente por meio da técnica de esgotamento em quadrante em um dos seguintes meios de cultura sólidos: Sabouraud Dextrose Agar com 0,1 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, USA) para *C. albicans* (incubação a 37°C em estufa aeróbia por 48 horas) e Agar Infusão Cérebro e Coração (BHI) (Modelo: K25-610007, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) para *S. mutans* (incubação em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C durante o mesmo período de tempo).

O pré-inóculo foi feito após o crescimento das colônias. Em um tubo tipo Falcon com 10 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB) foram inoculadas 5 colônias de *C. albicans*, e em outro tubo contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), foram inoculadas 10 colônias de *S. mutans*. Os tubos foram levados ao aparelho Vórtex e incubados *overnight* (16-18 horas) em estufa aeróbica (*C. albicans*) e de CO<sub>2</sub> 5% (*S. mutans*) a 37°C.

Após esse período, os pré-inóculos foram diluídos em duas razões (1:20 e 1:10) para realização do inóculo. Sendo assim, para *C. albicans* diluiu-se o pré-inóculo na razão de 1:20; 500 µL foram pipetados em um tubo com 9,5 mL de meio líquido YNB. Para *S. mutans* foi feita a diluição na razão 1:10; 1000 µL do pré-inóculo foram pipetados em um tubo com 9,5 mL de BHI caldo. Então, os tubos foram vortexados e as leituras no espectrofotômetro, com filtro de 540 nm para *C. albicans* e 600 nm para o *S. mutans*, foram realizadas para medição da densidade óptica (DO). Alíquotas de 1 mL dos inóculos foram transferidos para cubetas e foi feita a primeira leitura, denominada DO<sub>0</sub>. Em sequência, os tubos foram incubados nas determinadas estufas para cada micro-organismo até atingir as fases de *mid-log* das curvas de crescimento pré-estabelecida, durante 8 horas para *C. albicans* e 4 horas para *S. mutans*. Nova leitura da DO foi realizada, depois do período de incubação, para confirmar o crescimento dos micro-organismos que correspondiam a aproximadamente 0,550 A, 1x 10<sup>6</sup> UFC/mL para *C. albicans*, e 0,683 A, 1x10<sup>7</sup> UFC/mL para *S. mutans*.

Os tubos, então, foram levados a centrífuga à 4°C por 5 minutos com 10.000 rpm para formação de “pellet”. Em seguida, o pellet foi lavado com Tampão Fosfato Salino (PBS), levado para centrífuga e novamente lavado com PBS. Após duas lavagens os micro-organismos foram ressuspensos em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640).

#### **4.5 Preparo das Frações da Folha de *C. moschata***

As 4 frações secas alocadas em frascos foram solubilizadas com 2 mL de dimetilsulfóxido de dimetilo (DMSO), constituindo a solução mãe. Delas foram retirados 40 µL da fração que foram diluídos em 960 µL de PBS, totalizando 1 mL para ser utilizado nos testes microbiológicos. O DMSO foi o veículo de trabalho utilizado, na concentração de 2%.

#### **4.6 Concentração Inibitória Mínima das Frações de *C. moschata***

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi conduzida em placas de cultura contendo 96 poços (Kasvi), seguindo o procedimento preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>71</sup>.

Os valores foram determinados pela incubação estática das suspensões dos micro-organismos por 24 horas à 37°C, expostos à diferentes grupos experimentais. Após 24 horas de contato, o valor da CIM foi dado pela menor concentração do extrato em mg/mL<sup>-1</sup>, capaz de impedir o crescimento microbiano, observado pela turvação visual ou não do meio de cultura.

Essa análise foi realizada nos seguintes grupos:

- 1: RPMI-1640 com micro-organismo (controle negativo);
- 2: Fração Hex nas concentrações de 100% a 6,25%;
- 3: Fração AcOEt/Hex nas concentrações de 100% a 6,25%;
- 4: Fração AcOEt nas concentrações de 100% a 6,25%;
- 5: Fração H<sub>2</sub>O nas concentrações de 100% a 6,25%;
- 6: DMSO com micro-organismo (controle do veículo).

#### **4.7 Grupos Experimentais para Avaliação da Atividade Antimicrobiana em Células Planctônicas**

As frações Hex e H<sub>2</sub>O, bem como algumas concentrações das outras frações, não foram efetivas na avaliação da CIM. Assim, os grupos utilizados para investigar a atividade antimicrobiana em células planctônicas de *C. albicans* foram os seguintes:

Controle negativo: RPMI-1640 com micro-organismo;

AcOEt/Hex: Fração Acetato/Hexano 1:1 nas concentrações de 100% e 50%;

AcOEt: Fração Acetato de etila 100% nas concentrações de 100%;

Controle DMSO: Controle DMSO com micro-organismo;

Controle do meio: RPMI-1640 sem micro-organismo.

#### **4.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Frações de *C. moschata* em Células Planctônicas**

Para avaliar a atividade antimicrobiana das frações, inicialmente, foi feito um estudo piloto com as células planctônicas de *S. mutans* e *C. albicans* considerando n=4. Esses experimentos foram feitos em duplicata em duas ocasiões independentes. Levando em consideração os resultados não satisfatórios com a bactéria, não foram realizadas mais ocasiões com as células planctônicas de *S. mutans*. Dessa forma, foram feitas mais duas ocasiões independentes em triplicata (n=10) somente com as células planctônicas de *C. albicans*. Os resultados do estudo piloto com *S. mutans* serão mostrados nos resultados.

As etapas de reativação dos micro-organismos, pré-inóculos e inóculos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.4. Entretanto, considerando a alta quantidade de micro-organismos, para os ensaios com células planctônicas, os inóculos foram diluídos após a primeira ressuspensão em RPMI-1640 da seguinte forma: em um tubo contendo 9 mL e 900 µL de RPMI-1640 foram adicionados 100 µL do inóculo de *C. albicans*. Após isso, em outro tubo com 9 mL de RPMI-1640 foi adicionado 1 mL do tubo anterior com inóculo de *C. albicans* para chegar na concentração de  $1 \times 10^3$  UFC/mL. Em relação ao inóculo de *S. mutans*, em um tubo contendo 9 mL e 900 µL de RPMI-1640 foram adicionados 100 µL do inóculo de *S. mutans*, chegando na concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

Em uma placa de 96 poços 100 µL da ressuspensão com os micro-organismos e 100 µL das frações foram adicionados, totalizando 200 µL em cada poço. Em

seguida, as placas foram incubadas por 24 horas à 37°C em estufa com CO<sub>2</sub> 5% (*S. mutans*) e estufa aeróbica (*C. albicans*)<sup>21</sup>.

Após o período de incubação, verificou-se visualmente os poços para avaliar a turbidez (indicativa de crescimento microbiano) ou a claridade (indicativa de ausência de crescimento). No entanto, os resultados da inspeção visual foram inconsistentes devido às variações de cor nas amostras, e, portanto, esses dados não foram apresentados. Ao medir a turbidez utilizando um leitor de microplacas (Leitor de placas ELISA, Biochrom Ez, Cambourne, Reino Unido), enfrentou-se dificuldades devido à deposição de grânulos provenientes da planta no fundo dos poços<sup>72,73</sup>.

Posteriormente, foi determinada a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de cada solução (grupos experimentais) para cada micro-organismo. Para isso, uma alíquota de cada poço foi diluída em série 1:10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>) para *C. albicans* e 1:10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>) para *S. mutans* em PBS. Alíquotas de 10 µL para *S. mutans* e 20 µL para *C. albicans* foram plaqueadas em meio de cultura BHI e SDA em Placa de Petri, respectivamente. As placas foram levadas à incubação por 24 horas à 37°C em estufa com CO<sub>2</sub> 5% (*S. mutans*) e estufa aeróbica (*C. albicans*). Após esse período, as colônias foram contadas e os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foram calculados utilizando a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{Número de colônias} \times 10^n / q$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição escolhida e q equivale à quantidade, em mL, semeada de cada diluição nas placas.

#### **4.9 Grupos Experimentais para Avaliação das Frações de *C. moschata* sobre Biofilmes Simples e Misto de *C. albicans* e *S. mutans***

A atividade das frações de *C. moschata* foi analisada em biofilmes simples de *C. albicans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados sobre fundos de poços de uma placa de 24 poços. Os experimentos com o biofilme simples de *S. mutans* não foram realizados devido aos achados em células planctônicas. Entretanto, devido a interação dos dois micro-organismos que impacta na virulência de *C. albicans* e na formação do biofilme, achou-se importante testar as frações no biofilme misto.

Para a avaliação da atividade dos tratamentos em biofilmes simples de *C. albicans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans*, foram utilizados os seguintes grupos:

AcOEt/Hex: tratamento com a fração Acetato/Hexano 1:1;

AcOEt: tratamento com a fração de Acetato de etila 100%;

Nistatina: tratamento com solução de Nistatina a 100.000 UI/mL (como controle positivo);

DMSO: tratamento com DMSO (controle de veículo);

RPMI-1640: tratamento com meio RPMI-1640 (como controle negativo).

Sol. Antibiótica: Solução de Penicilina 100,000 UI/mL (controle positivo). Esse grupo foi utilizado somente para o biofilme misto.

#### **4.10 Avaliação das Frações de *C. moschata* sobre Biofilmes Simples de *C. albicans* e Misto de *C. albicans* e *S. mutans***

Foi realizado a formação de biofilme de 48 horas de *C. albicans* e misto com *C. albicans* e *S. mutans*. Para tanto, procedeu-se à reativação do micro-organismo, bem como à formação do pré-inóculo e inóculo, seguindo os procedimentos previamente descritos para células planctônicas (item 4.4). Foi observado o crescimento do micro-organismo à aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *C. albicans* (DO = 0,550 A) e  $1 \times 10^7$  UFC/mL de *S. mutans* (DO = 0,683 A). Após isso, os tubos com os inóculos passaram pela centrífuga e foram ressuspensos em RPMI-1640. Para formação do biofilme de *C. albicans* foram adicionados no fundo de uma placa de 24 poços 750  $\mu$ L de meio com *C. albicans* e 750  $\mu$ L de RPMI-1640 estéril, totalizando 1500  $\mu$ L. No biofilme misto, foram inseridos no fundo de uma placa de 24 poços, 750  $\mu$ L de meio com *C. albicans* e 750  $\mu$ L de meio com *S. mutans*. As placas foram incubadas por 90 minutos em incubadora de agitação orbital a 37°C e 76 rpm, para adesão das células. Após a fase de adesão, o conteúdo dos poços das placas foi removido delicadamente e as amostras lavadas duas vezes com 1000  $\mu$ L de PBS para remoção das células não aderidas. Foram adicionados 1500  $\mu$ L de meio RPMI novo. Depois de 24 horas, 750  $\mu$ L do meio nos poços foram retirados e o mesmo volume de meio RPMI (pH 7,0) foi adicionado. A placa foi mantida por mais 24 horas em estufa, totalizando 48 horas de formação do biofilme maduro. Após esse tempo, o meio foi aspirado e as células não aderentes foram removidas por lavagem dos biofilmes duas vezes com tampão PBS estéril. Posteriormente, 1 mL de cada tratamento foi adicionado sobre os biofilmes, permanecendo por 24 horas.

Os seguintes testes foram realizados para a análise da atividade anti-biofilme das frações de *C. moschata* sobre biofilmes simples de *C. albicans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans*: contagem das unidades formadoras de colônia (n=10),

avaliação do metabolismo celular (n=10) e análise qualitativa por microscopia de fluorescência confocal (n=2).

#### **4.10.1 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL)**

Após 24 horas de tratamento, o biofilme foi lavado duas vezes com 1000 µL de PBS. Em seguida, adicionou-se 200 µL de PBS nos poços da placa de 24 poços. Após isso, os biofilmes simples e misto foram individualmente desprendidas do fundo de placa por meio de raspagem com o *cell scraper* durante 1 minuto. 100 µL dessa suspensão do biofilme foram transferidos para tubo com 900 µL com PBS. Posteriormente, passou-se o tubo em agitador de bancada e 100 µL dessa solução foram transferidos a um outro tubo contendo 900 µL de PBS. Realizou-se quatro diluições seriadas ( $1 \times 10^4$ ) para o biofilme de *C. albicans* simples. No biofilme misto foram feitas seis diluições seriadas ( $1 \times 10^6$ ). Foram pipetadas as diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  na placa de Petri para *C. albicans* e as diluições de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para *S. mutans*. Alíquotas de 20 µL dessas diluições foram semeadas em duplicata em placas de SDA com 0,1 mg/mL de cloranfenicol para *C. albicans* e BHI com anfotericina B para *S. mutans*, as quais foram incubadas à 37°C por 48 horas nas determinadas estufas de acordo com o micro-organismo. Após esse período, as colônias foram contadas e os números de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) calculados como descrito anteriormente. Os experimentos foram feitos em três ocasiões distintas, sendo duas em triplicata e uma quadruplicada (n=10).

#### **4.10.2 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®**

O metabolismo celular dos biofilmes foi monitorado 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 dos biofilmes com os tratamentos experimentais (24 horas), o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS e, sobre as amostras, foram colocados 1500 µL de meio de cultura novo em cada orifício da placa. Em seguida, acrescentou-se 150 µL de solução de AlamarBlue®. Foram retirados 200 µL de cada poço e adicionados em três poços em uma microplaca (96 poços). 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 das amostras usando Fluoroskan Ascent (Fluoroskan Ascent FI, Thermo Fisher Scientific, Marietta, Ohio, USA) a 560 nm (A560)

e 590 nm (A590). Posteriormente, foi feita uma média dos três valores para medir o valor final. Os experimentos foram feitos em três ocasiões distintas, sendo duas em triplicata e uma quadruplicada (n=10).

#### **4.10.3 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal**

Para este teste, os biofilmes foram formados sobre o fundo dos poços de uma placa de 24 poços, como descrito nos itens 4.4 e 4.10 (n=2). Foram adicionados os tratamentos por 24 horas, os poços foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS estéril. Posteriormente, foram adicionados 350 µL da solução de Corante Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A solução foi preparada diluindo 1 µL de cada reagente: SYTO-9 e Iodeto de Propírdio (IP) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) em 998 µL de PBS, após isso, o eppendorf foi passado pelo Vórtex.

As placas foram incubadas por 30 minutos no escuro nas estufas determinadas. Após isso, o corante foi retirado e foi feita lavagem com 1 mL de PBS. Foram adicionados 500 µL de tampão PBS. A máxima excitação e emissão utilizadas foi de aproximadamente 480/500 nm para SYTO-9 e 490/635 nm para IP. Em seguida, imagens foram obtidas com um Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan), sendo as células vivas coradas em verde e as mortas em vermelho. As análises foram realizadas em objetiva de 10x de aumento.

É importante salientar que o Syto-9 é um corante de fluorescência verde, permeia todas as células no biofilme, enquanto o IP é um corante de fluorescência vermelha, que marca exclusivamente o DNA das células mortas. Assim, a prevalência da relação verde/vermelho reflete a viabilidade dessa cultura, indicando que quanto maior a predominância de marcação em verde e menor em vermelho, maior é a presença de células vivas na composição do biofilme.

#### **4.10.4 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal**

O dano nos componentes proteicos da matriz foi avaliado qualitativamente utilizando-se o microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan) e o Software ZEN BLUE 2.3 System. As amostras foram divididas em 12 slices, com ganho de 780 V e abertura de pinhole de 2,30 AU/ 85 µm. Para realização do ensaio, os biofilmes foram formados sobre os fundos de poços de uma placa de 24

poços como descrito anteriormente (itens 4.4 e 4.10), de acordo com seus grupos experimentais (n=2). Após os tratamentos, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão PBS (1000 µL) e posteriormente, 500 µL da solução de SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen™) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas em estufa com CO<sub>2</sub> a 37°C (*S. mutans*) e estufa aeróbica (*C. albicans*) durante 30 minutos, protegidas da luz. Após esse período, o marcador foi retirado das amostras, e em cada poço foram adicionados 500 µL do tampão PBS. A seguir, as amostras foram visualizadas no Microscópio de Fluorescência Confocal (excitação: 488 nm; detecção: 700 nm). Foram analisados campos equidistantes de uma mesma amostra e as análises foram realizadas em objetiva de 10x de aumento.

#### **4.11 Análise Estatística**

Os dados foram tabulados de maneira descritiva em tabelas no programa Excel® 2019. As contagens de micro-organismos, em UFC/mL, foram transformadas em logaritmo ( $\log_{10}$ ) para fins de análise estatística. Foram usados valores absolutos da leitura de fluorescência do AlamarBlue. O teste estatístico escolhido para análise das variáveis foi o teste U de Mann-Whitney, também conhecido como o Teste da Soma dos Postos de Wilcoxon. Os dados foram analisados utilizando o *software* R versão 4.3.1 com nível de significância de 5%.

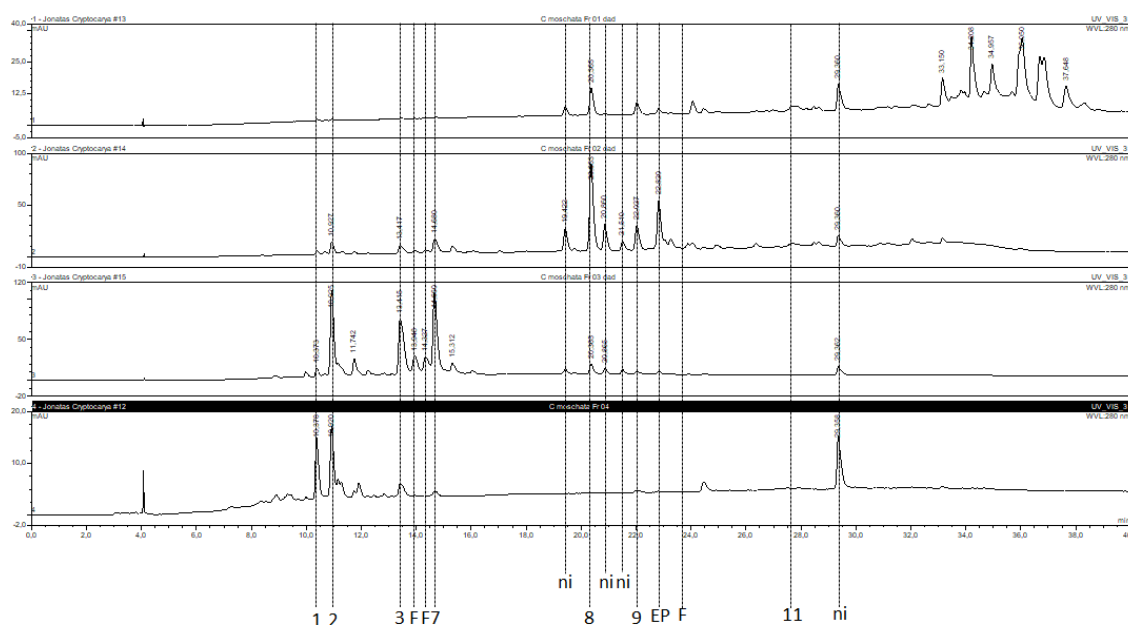
## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir da metodologia proposta estão demonstrados a seguir.

### 5.1 Caracterização Química das Frações da Folha de *C. moschata*

Quatro frações foram obtidas após o fracionamento do extrato de *Cryptocarya moschata*: Hexano 100% (Hex), Acetato/Hexano 1:1 (AcOEt/Hex), Acetato de etila 100% (AcOEt) e Água (H<sub>2</sub>O). Em relação a caracterização química das frações de *C. moschata*, Hex apresentou constituintes lipofílicos. A fração AcOEt/Hex concentra estilipironas, com destaque para a goniotalamina (8) e 6-estiril-2-pirona (9). Na fração AcOEt, predominam flavonoides glicosilados, derivados da quercetina (3-7) e o alcaloide xantoplanina (2), enquanto na fração aquosa, há predominância dos alcaloides menisperina (1) e xantoplanina (2) (Figuras 1 e 2).

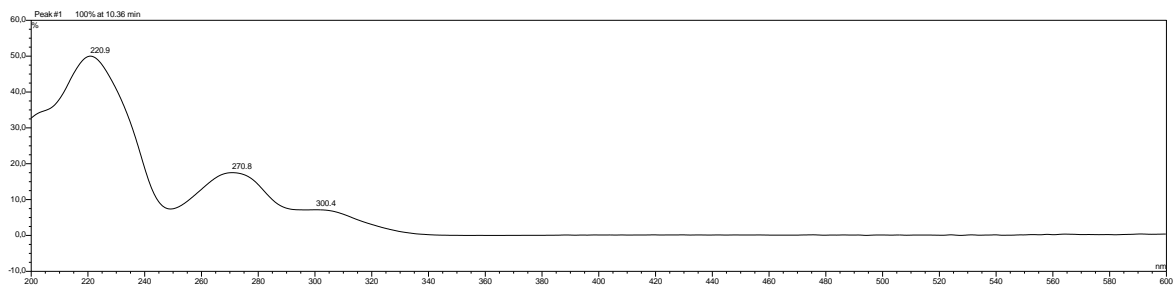
**Figura 1** - Cromatogramas das frações do extrato de *C. moschata*, obtidas por ELL. De cima para baixo: fração 01 (Hex), fração 02 (AcOEt/Hex), fração 03 (AcOEt) e fração 04 (H<sub>2</sub>O)



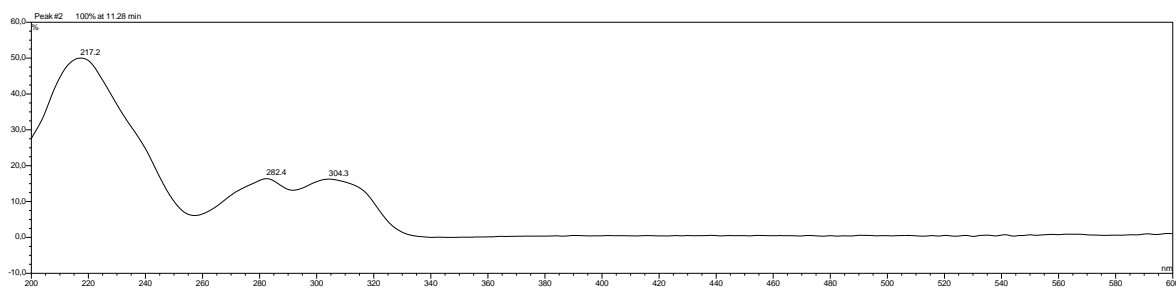
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

**Figura 2 - Espectros no UV dos principais metabólitos identificados nas frações do extrato de *C. moschata***

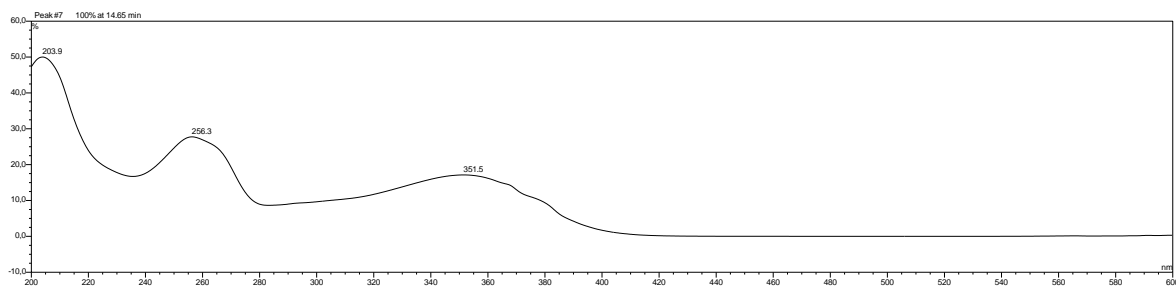
**Xantoplanina (1)**



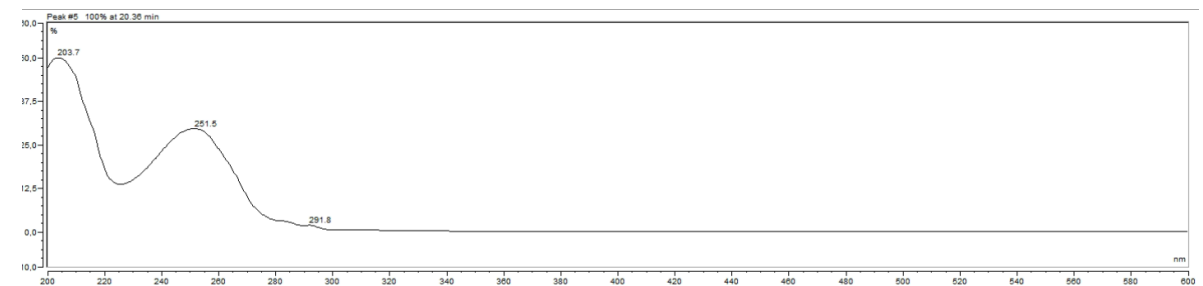
**Menisperina (2)**



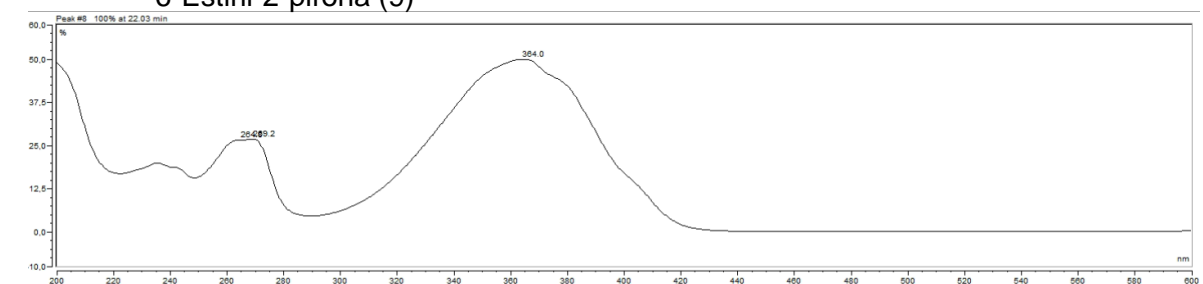
**Quercetina 3-O-galactopiranosídeo (3)**



**Goniotalamina (8)**



**6-Estiril-2-pirona (9)**



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

## 5.2 Concentração Inibitória Mínima das Frações de *C. moschata*

Após a diluição das frações em DMSO, as concentrações variaram entre 0,1 mg/mL e 2 mg/mL (Tabelas 1 e 2). Como mencionado anteriormente, as frações Hex e H<sub>2</sub>O, bem como algumas concentrações das outras frações, não foram efetivas na avaliação da CIM.

**Tabela 1** - Concentrações das frações de *C. moschata* utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana com *S. mutans*

Frações	Concentração
Hex	100% - 1,88 mg/mL
	50% - 0,94 mg/mL
	25% - 0,47 mg/mL
	12,5% - 0,235 mg/mL
	6,25% 0,1175 mg/mL
AcOEt/Hex	100% - 1,3 mg/mL
	50% - 0,65 mg/mL
	25% - 0,325 mg/mL
	12,5% - 0,1625 mg/mL
	6,25% - 0,08125 mg/mL
AcOEt	100% - 1,1 mg/mL
	50% - 0,55 mg/mL
	25% - 0,275 mg/mL
	12,5% - 0,1375 mg/mL
	6,25% - 0,0687 mg/mL
H <sub>2</sub> O	100% - 1,37 mg/mL
	50% - 0,685 mg/mL
	25% - 0,3425 mg/mL
	12,5% - 0,1718 mg/mL
	6,25% - 0,0859375 mg/mL

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 2** - Concentrações das frações de *C. moschata* utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana com *C. albicans*

<b>Frações</b>	<b>Concentração</b>
Hex	100% - 1,84 mg/mL
	50% - 0,92 mg/mL
	25% - 0,46 mg/mL
	12,5% - 0,23 mg/mL
	6,25% 0,115 mg/mL
AcOEt/Hex	100% - 1,68 mg/mL
	50% - 0,84 mg/mL
	25% - 0,42 mg/mL
	12,5% - 0,21 mg/mL
	6,25% - 0,105 mg/mL
AcOEt	100% - 2,25 mg/mL
	50% - 1,125 mg/mL
	25% - 0,5625 mg/mL
	12,5% - 0,28125 mg/mL
	6,25% - 0,1406 mg/mL
H2O	100% - 2,1 mg/mL
	50% - 1,05 mg/mL
	25% - 0,525 mg/mL
	12,5% - 0,2625 mg/mL
	6,25% - 0,13125 mg/mL

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana das Frações de *C. moschata* em Células Planctônicas

Os resultados obtidos a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) mostraram que não houve redução de células planctônicas de *S. mutans* em comparação com o controle (n=4). Além disso, o veículo de trabalho (DMSO) teve um crescimento microbiano adequado. Após análise estatística, em relação ao *S. mutans* foi verificado que todas as frações de *C. moschata* na concentração 100% não tiveram resultados estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3). Não foram apresentados os resultados com as concentrações menores devido aos resultados encontrados nos testes com a concentração inicial (100%).

**Tabela 3** - Valores de média e desvio padrão de log UFC/mL de células planctônicas de *S. mutans* após tratamento com frações de *C. moschata* comparadas ao controle negativo

Tratamentos	C. 100%	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	7,04 ± 0,73	--
Controle DMSO	7,18 ± 0,19	0,6631
AcOEt/Hex	6,22 ± 0,60	0,1124
AcOEt	6,78 ± 0,27	0,3094
Hex	6,70 ± 0,88	0,3123
Água	7,10 ± 0,46	1

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação a *C. albicans*, foi observado que a fração AcOEt/Hex na concentração de 100% (1,68 mg/mL) proporcionou redução das células planctônicas em 3 logs de UFC/mL em relação ao grupo controle. Além disso, a concentração 50% (0,84 mg/mL) da mesma fração diminuiu 2,2 logs de UFC/mL. A fração de AcOEt (2,25 mg/mL) reduziu em 1,08 logs o número de UFC/mL das células planctônicas. Todos os resultados com as frações de *C. moschata* foram estatisticamente significativos em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). O veículo de trabalho (DMSO) também teve um crescimento microbiano adequado pois o valor em log ficou aproximado ao controle (Tabela 4).

**Tabela 4** - Valores de média e desvio padrão de log UFC/mL de células planctônicas de *C. albicans* após tratamento com frações de *C. moschata* comparados ao controle negativo

Tratamentos	C. 100%	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)	C. 50%	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	6,61 ± 0,47	--	6,61 ± 0,47	--
Controle DMSO	6,78 ± 0,19	0,161		
AcOEt/Hex	3,60 ± 0,15	< 0,001	4,41 ± 0,35	< 0,001
AcOEt	5,53 ± 0,18	< 0,001		

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4 Concentrações das Frações de *C. moschata* Utilizadas para Análise em Biofilmes Simples de *C. albicans* e Misto de *C. albicans* e *S. mutans*

A partir dos resultados da atividade antimicrobiana em células planctônicas, observou-se que as frações de AcOEt/Hex e AcOEt mostraram capacidade de reduzir as células de *C. albicans*. Para utilização dessas frações em biofilme maduro, o valor encontrado na concentração que inibiu o crescimento em células planctônicas de *C. albicans* foi multiplicado por 2 (Tabela 5).

**Tabela 5** - Concentrações das frações de *C. moschata* utilizadas em biofilme simples de *C. albicans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans*

Frações	Concentração
AcOEt/Hex	3,36 mg/mL
AcOEt	4,5 mg/mL

Fonte: Elaboração própria.

#### 5.5 Avaliação das Frações de *C. moschata* sobre Biofilmes Simples de *C. albicans* e Misto de *C. albicans* e *S. mutans*

A partir dos resultados obtidos em células planctônicas, os efeitos das frações de *C. moschata* foram avaliados em biofilme.

### 5.5.1 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

No biofilme simples de *C. albicans* foi verificado uma redução de 5,13 logs de UFC/mL da fração AcOEt/Hex na concentração de 3,36 mg/mL, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). A fração de AcOEt na concentração de 4,5 mg/mL proporcionou uma diminuição menos significativa do número UFC/mL, mas também com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,001$ ). A Nistatina (controle positivo), na contagem do número de UFC/mL, inibiu completamente o biofilme de *C. albicans*. O DMSO não impactou na redução do biofilme maduro, ficando semelhante ao controle sem tratamento. Esses resultados estão descritos na Tabela 6 e no Gráfico 1.

**Tabela 6** - Valores de média e desvio padrão de log UFC/mL de biofilme simples de *C. albicans* após tratamento com frações de *C. moschata* comparados ao controle negativo

Tratamentos	UFC/mL	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	7,18 ± 0,16	--
Controle DMSO	7,05 ± 0,23	0,403
Nistatina	0 ± 0	< 0,001
AcOEt/Hex	2,19 ± 2,84	< 0,001
AcOEt	6,76 ± 0,36	0,017

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

**Gráfico 1** - Resultados de crescimento em log UFC/mL do biofilme simples de *C. albicans* após tratamento com as frações de *C. moschata* e controles

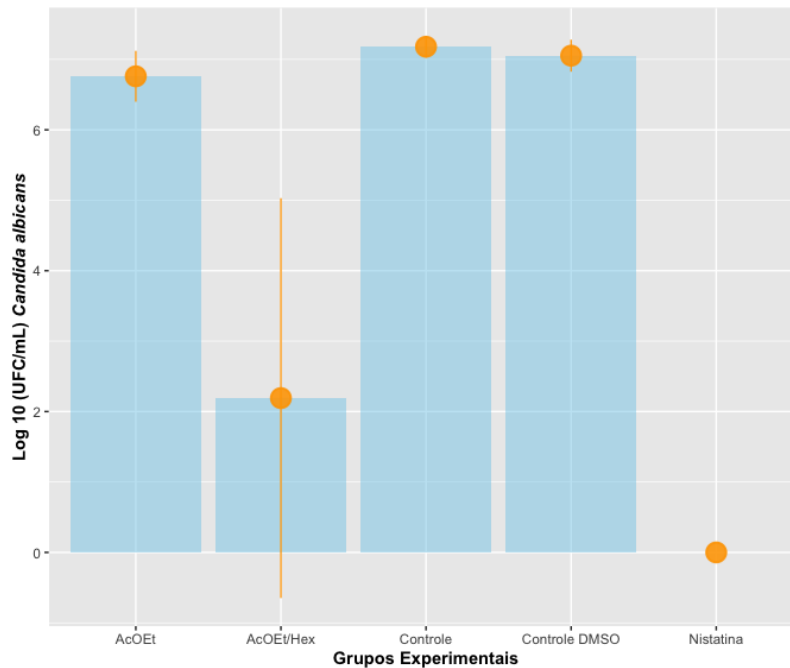


Gráfico de Média  $\pm$  Desvio Padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao *S. mutans* no biofilme misto, foi observada redução de 3,75 logs de UFC/mL ao utilizar a fração de AcOEt/Hex ( $p < 0,05$ ). A solução de antibiótico (controle positivo) inibiu completamente o biofilme de *S. mutans*. O veículo de diluição, DMSO, não foi capaz de reduzir o biofilme de *S. mutans* na concentração utilizada. Entretanto, o valor de  $p$  foi significativo devido aos valores de desvio padrão desse grupo comparado ao controle (Tabela 7 e Gráfico 2).

**Tabela 7** - Valores de média e desvio padrão de log UFC/mL de *S. mutans* em biofilme misto após tratamento com frações de *C. moschata* comparados ao controle negativo

Tratamentos	UFC/mL	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	8,77 $\pm$ 0,16	--
DMSO	8,05 $\pm$ 0,29	< 0,001
Sol. Antibiótica	0 $\pm$ 0	< 0,001
AcOEt/Hex	5,02 $\pm$ 3,50	< 0,001
AcOEt	7,73 $\pm$ 0,26	< 0,001

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

**Gráfico 2** - Resultados de crescimento em log UFC/mL de *S. mutans* em biofilme misto após tratamento com as frações de *C. moschata* e controles

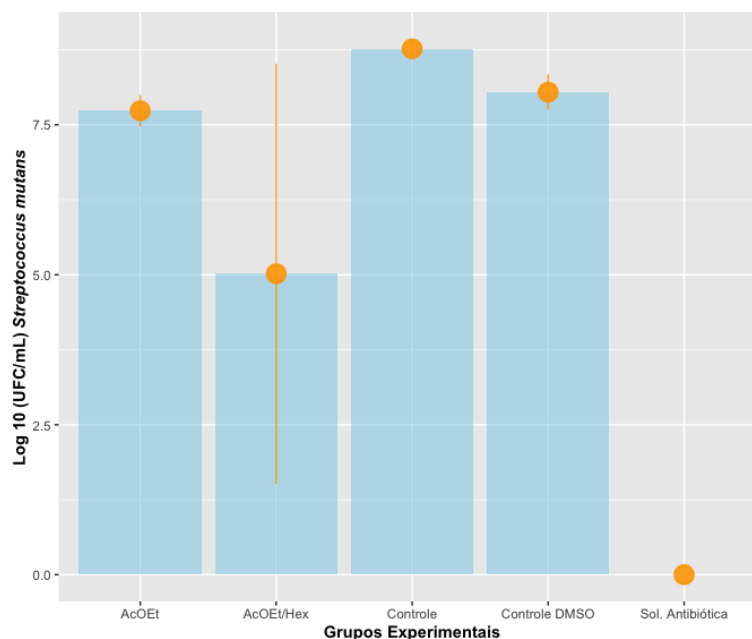


Gráfico de Média  $\pm$  Desvio Padrão.

Fonte: Elaboração própria.

A fração AcOEt/Hex reduziu em 1,66 logs o número de UFC/mL as células de *C. albicans* no biofilme misto, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Na fração de AcOEt não houve diferença estatística comparado ao controle, tendo comportamento semelhantes de crescimento microbiano. O controle DMSO não reduziu o biofilme de *C. albicans*. A Nistatina, usado como controle positivo, inibiu completamente o crescimento da *C. albicans* em biofilme misto (Tabela 8 e Gráfico 3).

**Tabela 8** - Valores de média e desvio padrão de log UFC/mL de *C. albicans* em biofilme misto após tratamento com frações de *C. moschata* comparados ao controle negativo

Tratamentos	UFC/mL	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	7,06 $\pm$ 0,19	--
Controle DMSO	6,99 $\pm$ 0,23	0,432
Nistatina	0 $\pm$ 0	< 0,001
AcOEt/Hex	5,40 $\pm$ 0,62	< 0,001
AcOEt	7,03 $\pm$ 0,15	0,191

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

**Gráfico 3** - Resultados de crescimento em log UFC/mL de *C. albicans* em biofilme misto após tratamento com as frações de *C. moschata* e controles

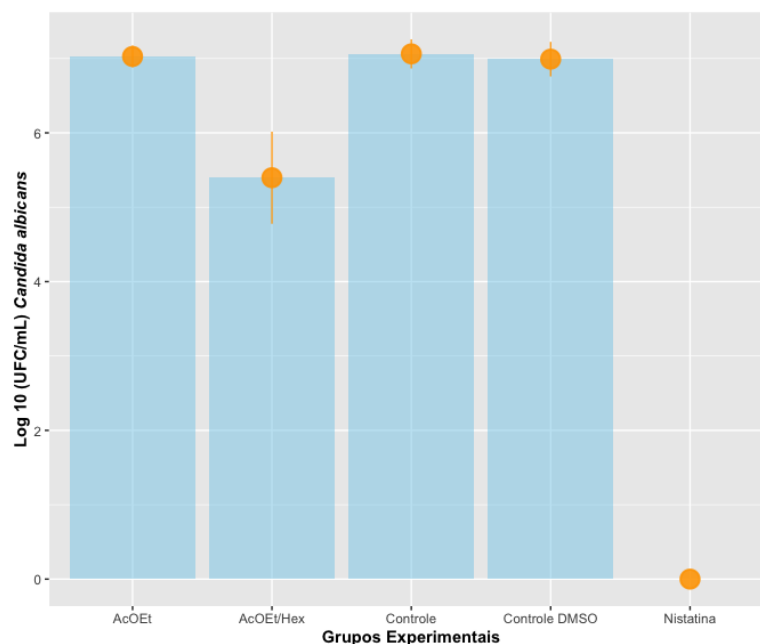


Gráfico de Média  $\pm$  Desvio Padrão.

Fonte: Elaboração própria.

### 5.5.2 Avaliação do metabolismo celular por meio do teste AlamarBlue®

Os resultados do AlamarBlue® mostram o metabolismo celular dos biofilmes através de valores de fluorescência. No biofilme simples de *C. albicans* verificou-se diminuição no metabolismo celular em todos os grupos de tratamento, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), sendo o mais efetivo o grupo tratado com a fração de AcOEt/Hex, o qual teve comportamento semelhante ao grupo controle positivo (Nistatina). Esses resultados estão descritos na Tabela 9 e Gráfico 4.

**Tabela 9** - Valores de média e desvio padrão do metabolismo celular de biofilme simples de *C. albicans* após tratamento com frações de *C. moschata* comparados ao controle negativo

Tratamentos	AlamarBlue®	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	15.769 ± 3.526	--
Controle DMSO	14.207 ± 5.316	0,529
Nistatina	3.085 ± 765	< 0,001
AcOEt/Hex	3.520 ± 636	< 0,001
AcOEt	10.424 ± 5.385	0,019

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

**Gráfico 4** - Resultados do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans* após tratamentos com as frações de *C. moschata* e controles

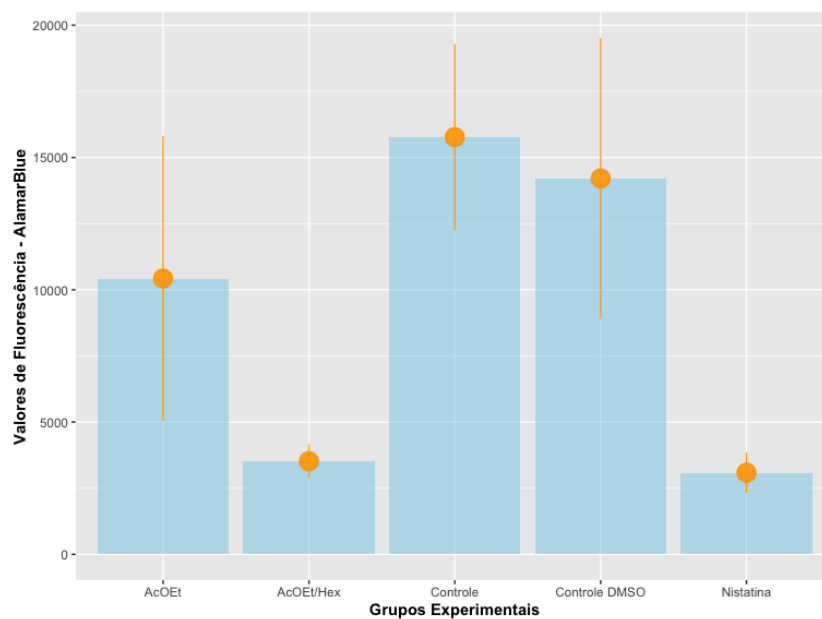


Gráfico de Média ± Desvio Padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Não houve diminuição do metabolismo celular do biofilme misto após tratamento com as frações, tendo sido os valores de média semelhantes ao grupo controle, sem diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). No caso da Nistatina e da Solução Antibiótica houve uma diminuição do metabolismo celular do biofilme misto com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). O grupo de controle DMSO também não afetou o metabolismo celular do biofilme misto (Tabela 10 e Gráfico 5).

**Tabela 10** - Valores de média e desvio padrão do metabolismo celular de *C. albicans* e *S. mutans* em biofilme misto após tratamento com frações de *C. moschata* comparados ao controle negativo

Tratamentos	AlamarBlue®	p-valor <sup>1</sup> (vs. Controle)
Controle	16.938 ± 1.702	--
Controle DMSO	17.898 ± 2.236	0,353
Nistatina	1.910 ± 131	< 0,001
Sol. Antibiótica	7.694 ± 1.209	< 0,001
AcOEt/Hex	15.308 ± 2.742	0,315
AcOEt	17.350 ± 815	0,353

<sup>1</sup>p-valor resultante do teste U de Mann-Whitney para comparação de grupos.

Fonte: Elaboração própria.

**Gráfico 5** - Resultados do metabolismo celular de *C. albicans* e *S. mutans* em biofilme misto após tratamentos com as frações de *C. moschata* e controles

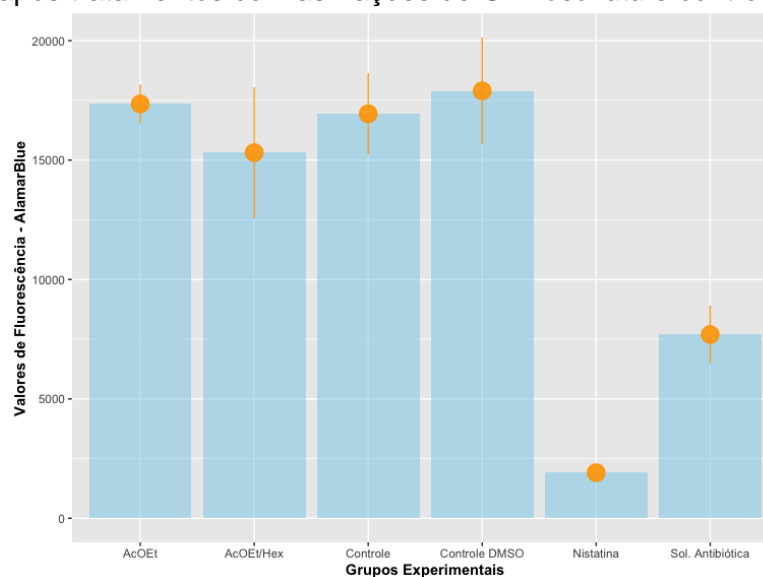


Gráfico de Média ± Desvio Padrão.

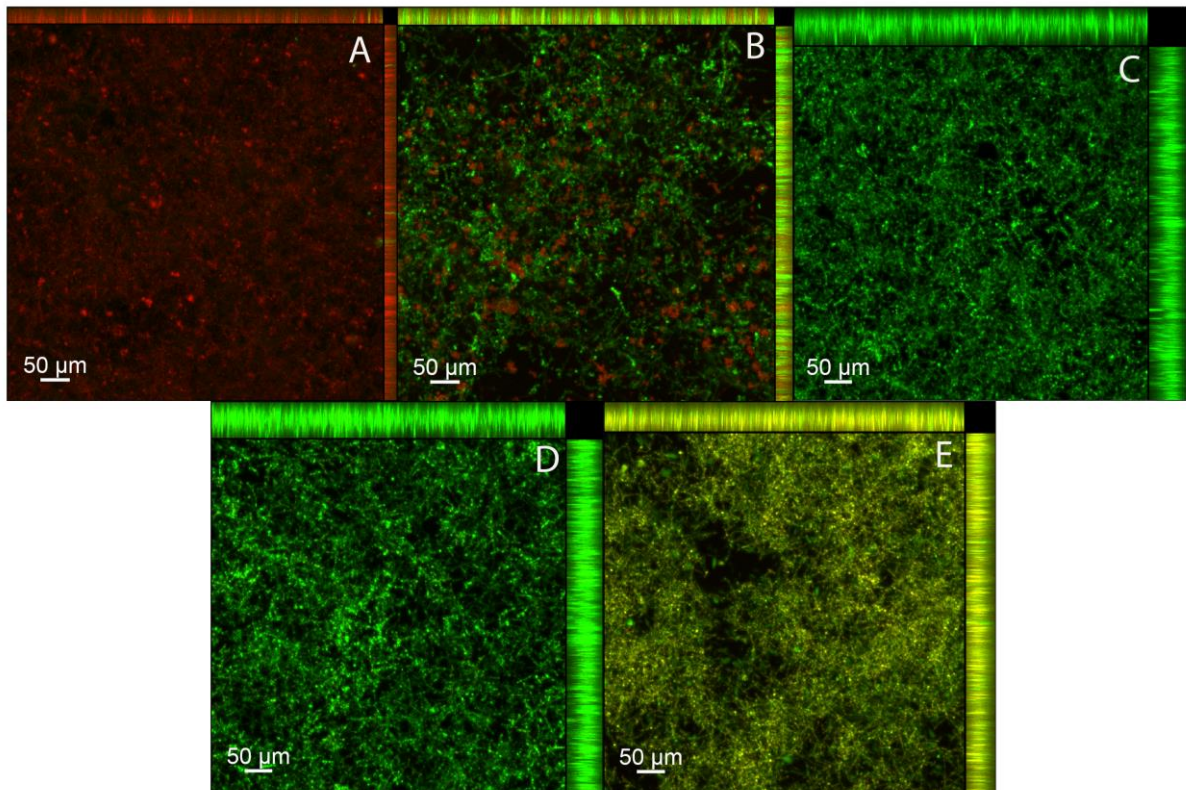
Fonte: Elaboração Própria.

### **5.5.3 Avaliação da viabilidade celular por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal**

Independentemente do tipo de biofilme, pode-se visualizar que o grupo controle negativo (Figuras 3 e 4 - D) apresentou maior espessura de biofilme quando comparado com os demais grupos. Nos dois tipos de biofilme, simples e misto, os grupos tratados com DMSO apresentaram maior prevalência de células coradas em verde, significando que as células do biofilme estavam vivas (Figura 3 e 4 – C).

No biofilme simples de *C. albicans* observou-se que o tratamento com a fração AcOEt/Hex teve maior predominância de células mortas (coradas em vermelho), quando comparado ao grupo controle, o qual teve maior quantidade células vivas (coradas em verde) (Figura 3 – A e D). O controle positivo (Nistatina), apresentou menor redução da viabilidade do biofilme, porém mostrou uma desorganização da estrutura do biofilme simples de *C. albicans*. (Figura 3 – E).

**Figura 3** - Imagens dos biofilmes simples de *C. albicans* analisadas por Microscopia de Fluorescência Confocal. Células coradas em vermelho representam o número de células mortas

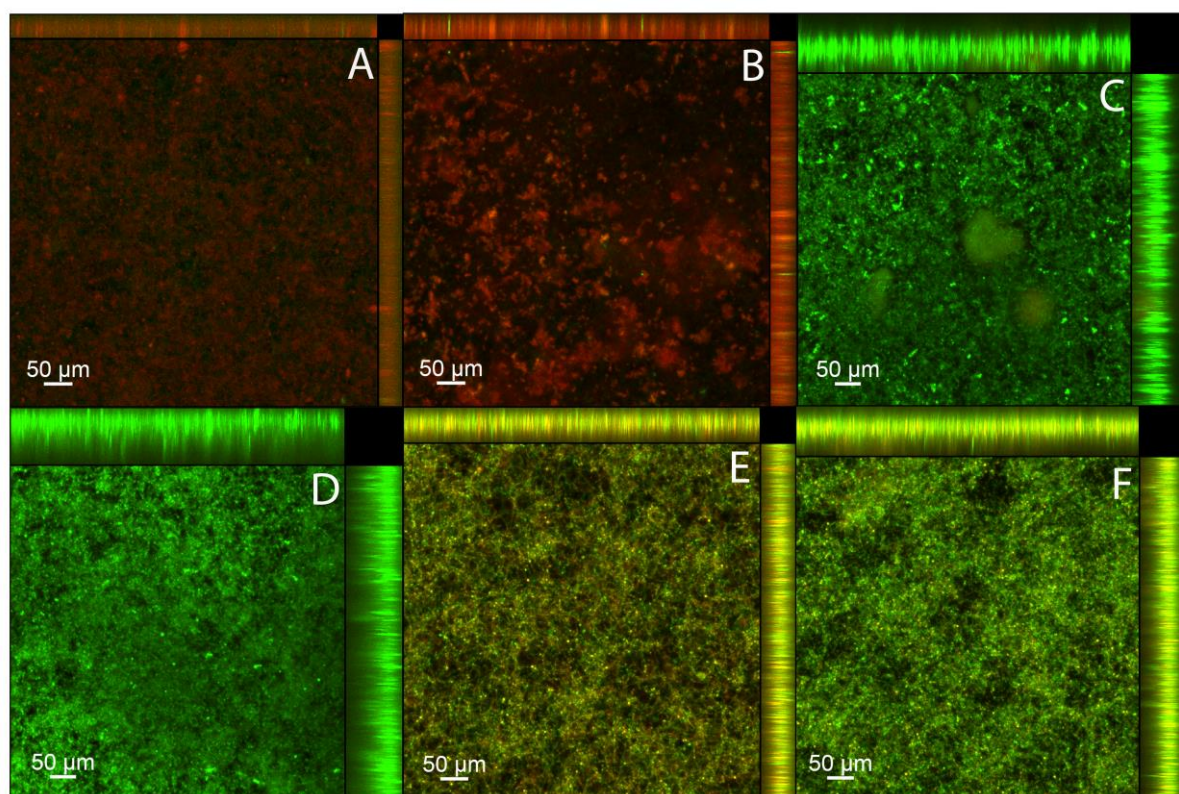


Legenda: **A**: Imagem de biofilme após tratamento com AcOEt/Hex; **B**: Imagem de biofilme após tratamento com AcOEt; **C**: Imagem de biofilme em contato com DMSO; **D**: Imagem de biofilme sem tratamento (Grupo Controle); **E**: Imagem de biofilme após tratamento com Nistatina. Imagens captadas com objetiva de 10x de aumento.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

No biofilme misto houve redução das células vivas com o uso das frações AcOEt/Hex e AcOEt, quando as imagens foram comparadas ao controle sem tratamento (Figura 4 – A e B). Os controles positivos, Nistatina e Solução Antibiótica, tiveram uma menor redução da viabilidade do biofilme em relação às frações de *C. moschata* (Figura 4 – E e F).

**Figura 4** - Imagens dos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. mutans* analisadas por Microscopia de Fluorescência Confocal. Células coradas em vermelho representam o número de células mortas



Legenda: **A:** Imagem de biofilme após tratamento com AcOEt/Hex; **B:** Imagem de biofilme após tratamento com AcOEt; **C:** Imagem de biofilme em contato com DMSO; **D:** Imagem de biofilme sem tratamento (Grupo Controle); **E:** Imagem de biofilme após tratamento com Nistatina; **F:** Imagem de biofilme após tratamento com Sol. Antibiótica. Imagens captadas com objetiva de 10x de aumento.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

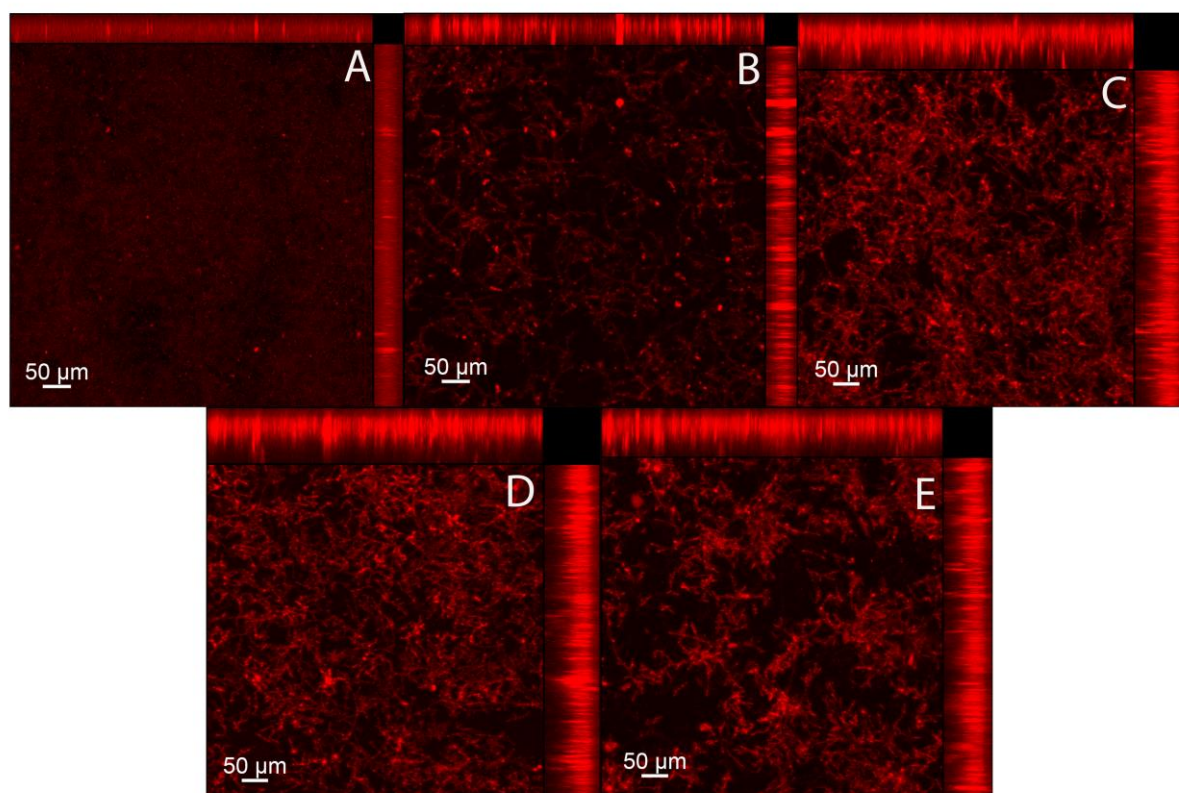
#### 5.5.4 Avaliação dos componentes proteicos da matriz do biofilme por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal

Os efeitos nos elementos da matriz extracelular dos biofilmes foram examinados pós-tratamentos. A matriz polimérica extracelular representa aproximadamente 90% da biomassa total do biofilme e desempenha o papel de uma barreira física protetora para as células. Sua espessura e composição química podem dificultar a penetração de antimicrobianos nas camadas mais profundas dos biofilmes, conferindo às células uma maior tolerância aos tratamentos. Os componentes identificados em vermelho foram marcados utilizando o Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain. Essa sonda fluorescente é comumente empregada para corar os elementos proteicos presentes na matriz de biofilmes. Este corante é capaz de marcar diversas

classes de proteínas, incluindo glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas de ligação de cálcio, proteínas fibrilares, entre outras.

Na Figura 5 (A), é possível visualizar os danos aos componentes da matriz extracelular do biofilme simples de *C. albicans* devido a desestruturação do emaranhado formado pela matriz, quando comparado ao grupo controle (D). A Nistatina, possibilitou uma alteração morfológica parecida com a fração AcOEt (Figura 5 – E). Observa-se também menor espessura do biofilme após tratamento com as frações.

**Figura 5** - Avaliação dos danos aos componentes proteicos da matriz extracelular do biofilme simples de *C. albicans* após os tratamentos. Componentes visualizados em vermelho foram marcados com Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain



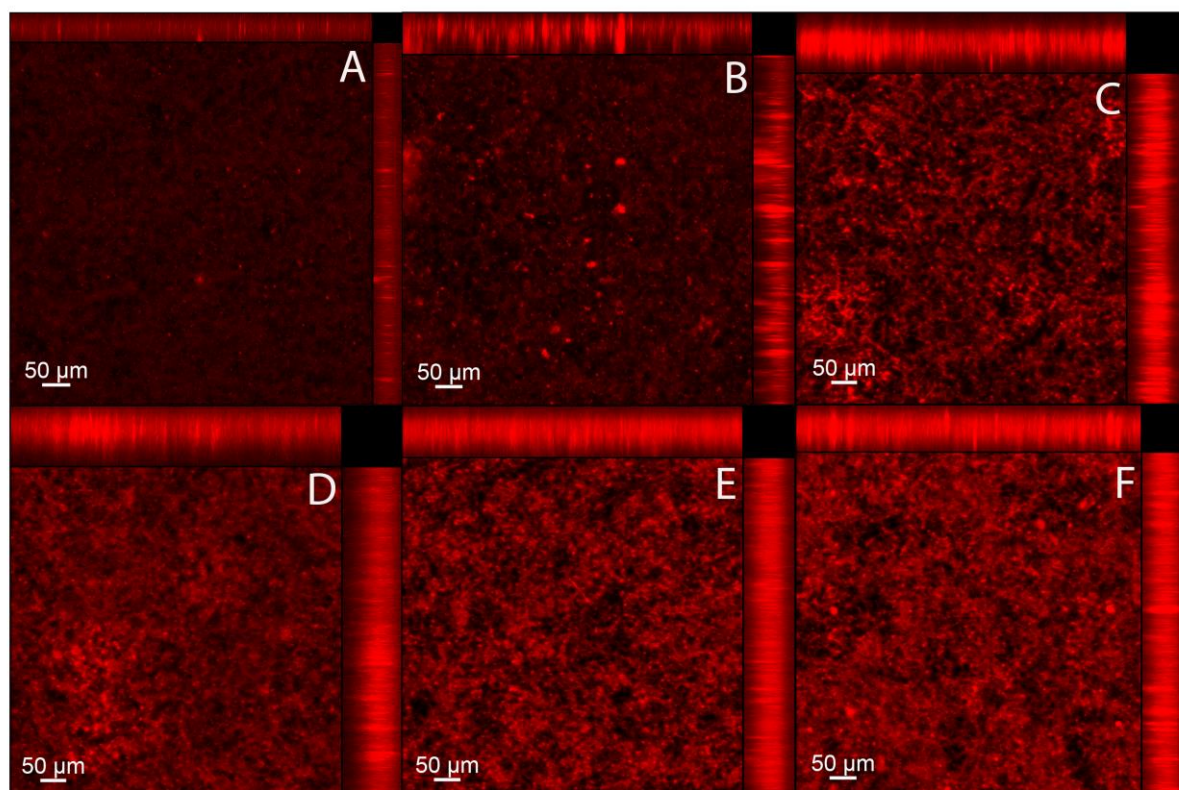
Legenda: **A:** Imagem da matriz extracelular após tratamento com AcOEt/Hex; **B:** Imagem da matriz extracelular após tratamento com AcOEt; **C:** Imagem da matriz extracelular em contato com DMSO; **D:** Imagem da matriz extracelular sem tratamento (Grupo Controle); **E:** Imagem da matriz extracelular após tratamento com Nistatina. Imagens captadas com objetiva de 10x de aumento.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

No biofilme misto foi visualizado uma desorganização da matriz extracelular após o tratamento com as frações, bem como redução da espessura do biofilme (Figura 6 – A e B). Os grupos, Nistatina (E) e Solução Antibiótica (F), estão mais

semelhantes ao grupo controle sem tratamento (D). Nos dois tipos de biofilmes, simples e misto, o grupo tratado com DMSO apresentaram preservação da matriz extracelular (Figura 5 e 6 – C). Ainda, é possível visualizar que a matriz do biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans* é mais espessa quando comparada ao biofilme simples de *C. albicans* (Figura 5 e 6).

**Figura 6** - Avaliação dos danos aos componentes proteicos da matriz extracelular do biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans* após os tratamentos. Componentes visualizados em vermelho foram marcados com Sypro Ruby Biofilm Matrix Stain



Legenda: **A**: Imagem da matriz extracelular após tratamento com AcOEt/Hex; **B**: Imagem da matriz extracelular após tratamento com AcOEt; **C**: Imagem da matriz extracelular em contato com DMSO; **D**: Imagem da matriz extracelular sem tratamento (Grupo Controle); **E**: Imagem da matriz extracelular após tratamento com Nistatina; **F**: Imagem da matriz extracelular após tratamento com Sol. Antibiótica. Imagens captadas com objetiva de 10x de aumento.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

## 6 DISCUSSÃO

O biofilme formado por bactérias e fungos desempenha papel importante no surgimento e desenvolvimento de várias doenças. Além disso, as infecções crônicas associadas ao biofilme são de difícil tratamento, uma vez que os biofilmes polimicrobianos podem reduzir a eficácia do medicamento por razões principalmente atribuídas à presença da matriz extracelular<sup>74</sup>. Este problema global culminou na realização de pesquisas com o intuito de encontrar alternativas para se combater infecções microbianas crônicas. Observou-se que metabólitos bioativos vegetais com atividade antibiofilme são recursos potenciais para diminuir esse problema. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano das frações de *C. moschata* contra *C. albicans* e *S. mutans*. A hipótese nula desse projeto foi parcialmente aceita, uma vez que os resultados mostraram que as frações foram capazes de reduzir o número de UFC/mL de células planctônicas de *C. albicans*, mas não reduziram o número das células planctônicas de *S. mutans*. Em relação ao biofilme simples de *C. albicans* e misto de *C. albicans* e *S. mutans* foi visto uma diminuição nos valores de UFC/mL, entretanto, o metabolismo celular não foi alterado. Nas imagens obtidas por meio de Microscopia de Fluorescência Confocal observou-se diminuição da viabilidade celular e danos na matriz extracelular nos dois tipos de biofilme quando comparados ao grupo controle.

Para utilização de plantas medicinais como terapia para doenças bucais é importante investigar quais são os compostos bioativos presentes no produto natural. Estudos são necessários para caracterizar amostras e definir quais são as moléculas que atuam no combate aos mais diversos micro-organismos. Com isso, a caracterização química das frações do extrato de *C. moschata* foi realizada através do método de HPLC-PAD. De acordo com os resultados, foram encontrados os seguintes componentes: estirilpironas, flavonoides glicosados e alcaloides, estando de acordo com outros estudos<sup>61,75,76</sup>.

As plantas do gênero *Cryptocarya* são uma rica fonte de óleos essenciais, extratos brutos, e compostos isolados que possuem uma variedade de efeitos farmacológicos, incluindo atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidativas, antidiabéticas e antivirais. Em uma revisão sobre a fitoquímica e atividades farmacológicas de plantas do gênero *Cryptocarya*, aproximadamente 50 espécies, foi relatado o isolamento de 389 metabólitos secundários. Os mais

encontrados foram: alcaloides, flavonoides e  $\alpha$ -pironas. Exemplos desses metabólitos são a goniotalamina e o criptofoliolano, considerados compostos bioativos<sup>20</sup>.

Em relação às células planctônicas, os resultados mostraram que as frações reduziram o número de UFC/mL de *C. albicans*. Por outro lado, não foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans*. *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária, mas está presente no biofilme formado sobre próteses dentárias. Essa bactéria é capaz de produzir grandes quantidades de metabólitos ácidos, como ácido láctico, resultando em microambientes de baixo pH<sup>77</sup>. Em função disso, *S. mutans* é altamente resistente à ambientes de baixo pH<sup>78</sup>, podendo explicar a resistência desse micro-organismo, em células planctônicas, frente às frações estudadas.

Diferente das células planctônicas, que ficam em suspensão, o biofilme maduro possui uma estrutura mais robusta, o que influencia na virulência e sobrevivência dos micro-organismos. Os biofilmes são envoltos em uma matriz extracelular tridimensional de substâncias poliméricas, como exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Essa matriz permite a adesão, coesão microbiana, favorece o crescimento, aumenta a estabilidade mecânica do biofilme e dificulta a difusão de agentes antimicrobianos<sup>79-83</sup> aumentando sua virulência. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde (NIH, EUA), cerca de 80% de todas as infecções microbianas são causadas por biofilmes<sup>84</sup>. Assim, a atividade anti-biofilme das frações de *C. moschata* também foi avaliada.

No biofilme de *C. albicans* ocorre a transição da forma de leveduras para hifas e pseudo-hifas, fato que também aumenta sua patogenicidade. Os resultados do presente estudo mostraram redução do número de UFC/mL do biofilme simples de *C. albicans* após tratamento com as frações Acetato/Hexano 1:1 e Acetato de etila 100% *C. moschata*. Esse resultado está condizente com estudos anteriores<sup>21,22</sup>, os quais observaram que o extrato bruto da *C. moschata* reduziu significativamente o número de UFC/mL do biofilme simples de *C. albicans*. Além disso, em modelo *in vivo*, o extrato bruto da planta causou diminuição do biofilme de *C. albicans*, semelhante ao grupo controle positivo (Nistatina), após tratamento de candidíase induzida na língua de camundongos<sup>22</sup>. Ainda, análise histopatológica comprovou a biocompatibilidade do extrato, uma vez que não causou danos celulares na língua dos animais<sup>22</sup>. Todavia, é importante ressaltar que os estudos prévios foram realizados com o extrato bruto da planta, e não com as frações. Esses resultados corroboram com os valores de

fluorescência obtidos no teste AlamarBlue, no qual verificou-se redução do metabolismo celular do biofilme simples de *C. albicans*.

Diferentes estudos foram encontrados na literatura sobre a atividade de frações de plantas medicinais contra *C. albicans*. Porém, nenhum estudo em relação às frações de *C. moschata* foi encontrado. Assim, somente comparações indiretas podem ser realizadas. Owusu-Boadi et al.<sup>85</sup> avaliaram a ação das frações de *Musa paradisiaca* em *C. albicans* e os resultados demonstraram efeitos inibitórios da densidade celular de *C. albicans*, comparados aos efeitos da Nistatina. Em uma pesquisa avaliando o potencial antimicrobiano de 42 diferentes extratos, óleos vegetais aquosos e frações verificou-se que as frações de hexano do caule e das folhas de *Ixora coccinea*, a fração de metanol das flores de *Cassia fistula* e a fração clorofórmica das folhas de *C. fistula* foram efetivas contra *C. albicans*<sup>86</sup>. Em outro estudo, a atividade antimicrobiana de um flavonoide denominado astragalina em células planctônicas de *C. albicans* foi avaliada. Os resultados mostraram ação antifúngica do composto estudado<sup>87</sup>.

A cavidade oral possui uma diversidade de micro-organismos que podem ser patogênicos se o hospedeiro entrar em supressão imunológica ou na presença de alterações no ambiente bucal, como é o caso de *C. albicans* e *S. mutans*. Há evidências na literatura de que biofilmes multiespécies contendo ambos os micro-organismos podem afetar negativamente o hospedeiro e promover infecções<sup>88</sup>. A associação entre bactérias e fungos pode ser antagônica ou cooperativa. É cooperativo quando micro-organismos fornecem substratos e/ou metabólitos para estimular o crescimento do outro. Por exemplo, *C. albicans* não metaboliza eficientemente a sacarose, mas é favorecida por produtos degradados da sacarose por *S. mutans* (glicose e frutose). Em contrapartida, a presença de *C. albicans* no biofilme altera o ambiente físico, favorecendo o aumento de exopolissacarídeos e, conseqüentemente, o acúmulo e formação de colônias de *S. mutans*<sup>88</sup>. Biofilmes formados por *C. albicans* e *S. mutans* podem levar a uma maior formação de hifas, ocasionando maior invasão tecidual. Isso resulta em aumento na virulência e patogenicidade do fungo, levando a respostas imunológicas intensificadas e danos teciduais<sup>89</sup>. Ainda, sabe-se que as glucosiltransferases de *S. mutans* (Gtfs) são depositadas na superfície das células de *C. albicans*. Ao quebrar a sacarose, essas enzimas produzem glucanos na parede celular do fungo, promovendo maior adesão entre os dois micro-organismos<sup>36,90,91</sup>. Em função desses aspectos, a atividade

antimicrobiana das frações de *C. moschata* foi avaliada sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*.

Os resultados do presente estudo em biofilme misto mostraram redução significativa do número de UFC/mL de *C. albicans* e *S. mutans* após tratamento com as frações, diferente do que ocorreu para as células planctônicas de *S. mutans*. Esse fato poderia ser explicado em função da maior concentração das frações de *C. moschata* utilizadas para os ensaios em biofilme. Não foram encontrados na literatura estudos que utilizem extrato ou frações de *C. moschata* em biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*. Por esta razão, apenas comparações indiretas podem ser realizadas. Em uma pesquisa que avaliou o efeito antimicrobiano de extratos de algumas plantas (*Pfaffia paniculata*, *Hamamelis virginiana*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Gymnema sylvestre*) em biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*, foi verificado que os extratos tiveram ação antimicrobiana sobre os dois microorganismos<sup>92</sup>. Garcia et al.<sup>93</sup> avaliaram a ação de micropartículas de quitosana carregadas com óleos essenciais sobre biofilme misto e observaram maior redução de células planctônicas de *C. albicans* do que *S. mutans*, entretanto, no biofilme maduro de ambas as espécies, houve redução da atividade metabólica, estando de acordo com os resultados do presente estudo.

Por outro lado, em relação ao teste AlamarBlue, os resultados de fluorescência mostraram que não houve diminuição do metabolismo celular do biofilme misto submetido ao tratamento com as frações. Esses resultados podem ser considerados inconclusivos devido à deposição da planta no fundo do poço da placa. Isso pode ter influenciado nas propriedades ópticas, como a densidade óptica, a qual pode interferir na transmissão de luz ou até mesmo na autofluorescência. Esses aspectos devem ser considerados quando são usados métodos colorimétricos ou fluorimétricos, como o AlamarBlue, uma vez que a deposição de elementos da planta pode interferir na leitura do teste ou até mesmo interagir com o reagente, podendo alterar os resultados<sup>94</sup>. Ainda, durante a leitura do metabolismo celular em biofilme misto, não há diferenciação entre as células de *C. albicans* e *S. mutans*. Assim, a interação entre as espécies pode ocasionar maior proliferação de uma delas e, mesmo com redução da atividade metabólica da outra, os valores de fluorescência não são reduzidos. De acordo com Lobo et al.<sup>88</sup> os biofilmes mistos de *S. mutans* e *C. albicans* são mais complexos, estruturados e exibem matriz extracelular mais organizada, tornando as

espécies mais tolerantes aos estresses ambientais. Ainda, a interação de *S. mutans* e *C. albicans* pode beneficiar ambas as espécies em biofilmes.

Os métodos quantitativos, como a contagem de UFC/mL e ensaios colorimétricos, são amplamente utilizados por serem simples e rápidos. No entanto, esses métodos apresentam algumas limitações, como a falta de precisão da contagem de UFC/mL, uma vez que os micro-organismos são destacados com esforço físico, o qual pode destruir a biomassa do biofilme, alterando, assim, as contagens microbianas<sup>95</sup>. Os resultados dos métodos colorimétricos podem ser influenciados pela substância antimicrobiana avaliada, dependendo da sua pigmentação<sup>94</sup>. Além disso, esses métodos são incapazes de fornecer quaisquer informações sobre a arquitetura tridimensional do biofilme.

Sendo assim, a viabilidade celular também foi avaliada qualitativamente em Microscopia Confocal a Laser, que é uma das técnicas mais sensíveis e específicas para visualização e análise da estrutura do biofilme<sup>95</sup>. As imagens mostraram que os tratamentos com as frações reduziram o número de células vivas (em verde) com predominância de células mortas (em vermelho), tanto para o biofilme simples de *C. albicans* como para o misto. Esses resultados estão compatíveis com os obtidos pela contagem de UFC/mL.

Uma das estratégias eficazes para o tratamento de biofilmes é a sua remoção através do uso de enzimas capazes de destruir matriz extracelular. A destruição de seus componentes pode levar à perda da integridade estrutural do biofilme<sup>96</sup>. Por exemplo, a Nistatina possui como mecanismo de ação a ligação aos esteróis da membrana celular, alterando a permeabilidade da membrana, o que resulta na morte celular<sup>97</sup>. Assim, os componentes da matriz extracelular foram marcados para análise estrutural dos biofilmes após os tratamentos utilizando a Microscopia de Fluorescência a Laser. Tanto para o biofilme simples de *C. albicans* quanto para o biofilme misto, observou-se diminuição do número de componentes marcados bem como da espessura dos biofilmes tratados com as frações de *C. moschata*, estando de acordo com os demais resultados.

Os resultados mais promissores foram obtidos após tratamento com AcOEt/Hex. O efeito antimicrobiano dessa fração pode estar relacionado aos seus componentes. A goniotalamina é um composto bioativo incluído no grupo das estirilpironas. Esse componente é conhecido por seu efeito anticancerígeno, genotoxicidade e antiproliferativo por induzir apoptose celular. Somado a isso, foi

também comprovado seu efeito antimicrobiano contra fungos e bactérias<sup>98-103</sup>. Além disso, seu potencial anti-helmíntico também foi comprovado<sup>104</sup>. Em relação ao poder antimicrobiano da goniotalamina, Martins et al.<sup>105</sup> avaliaram a atividade antifúngica da (R)-goniotalamina (composto natural) e (S)-goniotalamina (composto sintético) contra seis espécies de *Candida*. Os resultados mostraram efeito inibitório tanto da adesão como da progressão dos biofilmes após exposição aos tratamentos. Além disso, os biofilmes tratados com goniotalamina foram menos densos e apresentaram menor número de hifas quando comparados aos grupos sem tratamento. O mecanismo de ação desse componente pode estar relacionado à inibição da adesão fúngica, etapa inicial para a formação do biofilme. De maneira geral, as estirilpironas são substâncias biologicamente ativas que possuem atividades anticancerígenas, antioxidantes, antifúngicas e antivirais. Os flavonoides são componentes que podem estar relacionados ao efeito antimicrobiano da fração AcOEt. Sabe-se que os flavonoides possuem diferentes propriedades farmacológicas, incluindo atividades antimicrobianas e antioxidantes<sup>21,106</sup>. Um possível mecanismo de ação dos flavonoides pode estar relacionado à inibição da síntese de proteínas, favorecendo a permeabilização da membrana e causando morte celular<sup>107</sup>.

Alguns estudos foram realizados para avaliar a atividade antimicrobiana de compostos naturais associados aos medicamentos sintéticos<sup>108-110</sup> e resultados promissores foram observados. Ainda, para que uma nova terapia seja proposta, estudos em animais e ensaios clínicos precisam ser realizados. Assim, estudos futuros são necessários objetivando avaliar a eficácia das frações em associação com medicamentos sintéticos, bem como para que esses compostos sejam usados clinicamente com segurança.

## 7 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração as limitações do presente estudo, pôde-se concluir que:

- a) As frações apresentaram constituintes lipofílicos, estirilpironas, principalmente a goniotalamina, flavonóides glicosados e alcalóides;
- b) As frações AcOEt/Hex e AcOEt de *C. moschata* tiveram efeito antimicrobiano sobre células planctônicas de *Candida albicans*;
- c) As frações AcOEt/Hex e AcOEt de *C. moschata* tiveram efeito antimicrobiano sobre biofilme simples de *Candida albicans* e misto de *C. albicans* e *Streptococcus mutans*.

## REFERÊNCIAS\*

1. Zakhari KN, McMurry WS. Denture stomatitis and methods influencing its cure. *J Prosthet Dent.* 1977; 37(2): 133-40.
2. Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil.* 2022; 29(11): 1115-9.
3. 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(8): 411-5.
4. 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(2): 141-9.
5. 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(1): 45-50.
6. 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(3): 160-6.
7. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part. 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J.* 1998; 43(3): 160-6.
8. McReynolds DE, Moorthy A, Moneley JO, Jabra-Rizk MA, Sultan AS. Denture stomatitis – an interdisciplinary clinical review. *J Prosthodont.* 2023; 23(7): 560-70.
9. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
10. Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, Yamaguchi N, Watanabe Y et al. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J Investig Clin Dent.* 2014; 5(4): 307-12.
11. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw, Stoner L. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2016; 25(4): 288-301.

---

\* 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>

12. Gad MM, Fouda SM. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dent Med Probl.* 2020; 57(1): 95-102.
13. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(19): 5678-98.
14. Awouafack MD, McGaw LJ, Gottfried S, Mbouanguere R, Tane P, Spiteller M et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complement Altern Med.* 2013; 13: 289.
15. Neglo D, Adzaho F, Agbo IA, Arthur R, Sedohia D, Tettey CO et al. Antibiofilm activity of *Azadirachta indica* and *Catharanthus roseus* and their synergistic effects in combination with antimicrobial agents against Fluconazole-resistant *Candida albicans* strains and MRSA. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022; 21: 9373524.
16. Abreu-Pereira CA, Gorayb-Pereira AL, Noveletto JVM, Jordão CC, Pavarina AC. Zerumbone disturbs the extracellular matrix of fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *J Fungi (Basel).* 2023; 9(5): 576.
17. Teles MMRS, Pinheiro AAV, Dias CS, Tavares JF, Filho JMB, Cunha EVL. Alkaloids of the Lauraceae. *Alkaloids Chem Biol.* 2019; 82: 147-304.
18. Silva YC, Silva SEM, Fernandes NS, Lopes NL, Orlandi PP, Nakamura CV et al. Antimicrobial substances from Amazonian *Aniba* (Lauraceae) species. *Nat Prod Res.* 2021; 35(5): 849-52.
19. Wang J, Su B, Jiang H, Cui N, Yu Z, Yang Y et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. *Fitoterapia.* 2020; 146: 104675.
20. Ha NM, Son NT. The Genus *Cryptocarya*: A review on phytochemistry and pharmacological activities. *Chem Biodivers.* 2023; 20(3): e202201102.
21. Zoccolotti JO, Cavalheiro AJ, Tasso CO, Ribas BR, Ferrise TM, Jorge JH. Antimicrobial efficacy and biocompatibility of extracts from *Cryptocarya* species. *PLoS One.* 2021; 16(12): e0261884.
22. Zoccolotti JO, Cavalheiro AJ, Tasso CO, Oliveira CC, Ribas BR, Ferrise TM, Costa CAS, Jorge JH. In vivo antifungal activity and biocompatibility of *Cryptocarya moschata*. *Arch Microbiol.* 2022; 204(9): 569.
23. Nwodo UU, Iroegbu CU, Ngene AA, Chigor VN, Okoh AI. Effects of fractionation and combinatorial evaluation of *Tamarindus indica* fractions for antibacterial activity. *Molecules.* 2011; 16(6): 4818-27.
24. Sa-Eed A, Donkor ES, Arhin RE, Tetteh-Quarcoo PB, Attah SK, Kabotso DEK et al. In vitro antimicrobial activity of crude propolis extracts and fractions. *FEMS Microbes.* 2023; 4: 1-8.

25. Bars PL, Kouadio AA, Bandiaky ON, Guehenec LL, Cochetière MF. Host's immunity and Candida Species associated with denture stomatitis: a narrative review. *Microorganisms*. 2022; 10(7): 1437.
26. Campos MS, Marchini L, Bernardes LAS, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(5): 419-24.
27. Prasad R. *Candida albicans: cellular and molecular biology*. 2th ed. Gurgaon: Springer International Publishing; 2017.
28. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Millillo L et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2): 139-43.
29. Kadosh D. *Candida albicans: cellular and molecular biology*. 2th ed. Gurgaon: Springer International Publishing; 2017.
30. Nobile CJ, Johnson AD. Candida albicans biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69: 71-92.
31. Gulati M, Nobile CJ. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016; 18(5): 310-21.
32. Moosazadeh M, Akbari M, Tabrizi R, Ghorbani A, Golkari A, Banakar M et al. Denture stomatitis and Candida albicans in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *J Dent (Shiraz)*. 2016; 17(3): 283-92.
33. Krzyściak W, Jurczak A, Kóscielniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(4): 499-515.
34. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA. The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(1): 10.1128.
35. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. *Prescott's Microbiology*. 10 ed. Mc Graw Hill Education, 2015.
36. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-anne K, Gregoire S, Pai CH et al. Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014; 82(5): 1968-81.
37. Fujinami W, Nishikawa K, Ozawa S, Hasegawa Y, Takebe J. Correlation between the relative abundance of oral bacteria and Candida albicans in denture and dental plaques. *J Oral Biosci*. 2021; 63(2): 175-183.
38. Wu R, Cui G, Cao Y, Zhao W, Lin H. Streptococcus mutans membrane vesicles enhance Candida albicans pathogenicity and carbohydrate metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 26: 940602.

39. Wu R, Tao Y, Cao Y, Zhou Y, Lin H. Streptococcus mutans membrane vesicles harboring glucosyltransferases augment Candida albicans biofilm development. *Front Microbiol.* 2020; 11: 581184.
40. Sampaio C, Pessan JP, Nunes GP, Magno MB, Maia LC, Exterkate R et al. Are the counts of Streptococcus mutans and Staphylococcus aureus changed in complete denture wearers carrying denture stomatitis? A systematic review with meta-analyses. *J Prosthet Dent.* 2023; 18(23): 00180-4.
41. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998; 185(8): 380-4.
42. Souza RF, Khiyani MF, Chaves CAL, Feine J, Barbeau J, Fuentes R et al. Improving practice guidelines for the treatment of denture-related erythematous stomatitis: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017; 18(1): 211.
43. Oliveira CE, Gasporoto TH, Dionísio TJ, Porto VC, Vieira NA, Santos CF. Candida albicans and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont.* 2010; 23(2): 158-9.
44. Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis.* 2007; 13(6): 508-12.
45. Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture stomatitis: causes, cures and prevention. *Prim Dent J.* 2017; 6(4): 46-51.
46. Bajunaid SO. How effective are antimicrobial agents on preventing the adhesion of Candida albicans to denture base acrylic resin materials? A Systematic Review. *Polymers (Basel).* 2022; 14(5): 908.
47. Kabawat M, Souza RF, Badaró MM, Konick L, Barbeau J, Rompré P. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont.* 2014; 27(4): 311-9.
48. Abuhajar E, Ali K, Zulfiqar G, Ansari KA, Raja HZ, Bishti S et al. Management of chronic atrophic Candidiasis (denture stomatitis) - a narrative review. *Int J Environ Res Public Health.* 2023; 20(4): 3029.
49. Sesma N, Morimoto S. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. *Journal of Bi dentistry and Biomaterials.* 2011; 2: 24-9.
50. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Dent.* 2014; 42(2): 99-106.
51. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020; 83(3): 770-803.
52. Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2015.

53. Dutreix L, Bernard C, Juin C, Imbert C, Girardot M. Do raspberry extracts and fractions have antifungal or anti-adherent potential against *Candida* spp.? *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 52(6): 947-53.
54. Tambur Z, Miljkovic-Selimovic B, Opacic D, Vukovic B, Malesevic A, Ivancajic L et al. Inhibitory effects of propolis and essential oils on oral bacteria. *J Infect Dev Ctries*. 2021; 15(7): 1027-31
55. Gharibpour F, Shirban F, Bagherniya M, Nosouhian M, Sathyapalan T, Sahebkar A. The effects of nutraceuticals and herbal medicine on *Candida albicans* in oral Candidiasis: a comprehensive review. *Adv Exp Med Biol*. 2021; 1308: 225-48.
56. Carvalho-Silva JMC, Gaspar CS, Reis AC, Teixeira ABV. Denture stomatitis: Treatment with antimicrobial drugs or antifungal gels? A systematic review of clinical trials. *J Prosthet Dent*. 2024; 8(23): 00829-6.
57. Quinet A, Baitello JB, Moraes PLR, Assis L, Alves FM. Lauraceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro [internet]. [acesso 2024 Jan 5] Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>.
58. Moraes PLR. Taxonomy of *Cryptocarya* species of Brazil. *Abc Taxa*. 2007; 3: 1-191.
59. Moraes PLR. Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Ness & Martius ex Ness (Lauraceae) [tese de doutorado]. Rio Claro: Instituto de Biociências da Unesp; 1997.
60. Dumontet V, Gaspard C, Hung NV, Fahy J, Tchertanov L, Sevenet T et al. New cytotoxic flavonoids from *Cryptocarya infectoria*. *Tetrahedron*. 2001; 57(29): 6189-96.
61. Cavalheiro AJ, Yoshida M. 6-[ $\omega$ -arylalkenyl]-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). *Phytochemistry*. 2000; 53(7): 811-9.
62. Nehme CJ, Moraes PLR, Tininis AG, Cavalheiro AJ. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). *Biochem Syst Ecol*. 2008; 36(8): 602-11.
63. Bandeira KF, Cavalheiro AJ. An LC–DAD Fingerprinting method for alkaloids, flavonoids and styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. *chromatographia*. 2009; 70(9): 1455-60.
64. Zonaro VA. Análise de estilipironas de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-MS [dissertação de mestrado]. Araraquara: Instituto de Química da Unesp; 2016.
65. Ricardo MAG, Andreo MA, Cavalheiro AJ, Gamboa IC, Bolzani VS, Silva DHS. Bioactive pyrones and flavonoids from *Cryptocarya aschersoniana* seedlings. *Arkivoc*. 2004; 6: 127-36.

66. Giocondo MP, Bassi CL, Telascrea M, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Silva DHS et al. Cryptomoschatone D2 from *Cryptocarya mandiocana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell lines. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009; 30(3): 315-22.
67. Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 680354.
68. Queiroz SCN, Collins CH, Jardim ICSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quím Nova.* 2001; 24(1): 68-76.
69. Blackadder DA, Nedderman RM. Manual de operações unitárias: destilação de sistemas binários, separação de solvente, absorção de gases, sistemas de múltiplos componentes, trocadores de calor, secagem, evaporadores, filtragem. 1ed. São Paulo: Hemus; 2004.
70. Treybal RE. Mass Transfer Operations (International ed). Singapore: McGraw-Hill Book Company; 1981.
71. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
72. Eloff JN. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. *Phytomedicine.* 2004; 11(4): 370-1.
73. Ribeiro SM, Fratucelli EDO, Bueno PCP, Castro MKV, Francisco AA, Cavalheiro AJ. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19(1): 308.
74. Bonincontro G, Scuderi AS, Marino A, Simonetti G. Synergistic effect of plant compounds in combination with conventional antimicrobials against biofilm of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida* spp. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023; 16(11): 1531.
75. Nehme CJ, Moraes PLR, Cavalheiro AJ. Intrapopulational variability of styrylpyrones in leaves of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from Carlos Botelho State Park. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2002; 30(6): 613-6.
76. Nehme CJ, Bastos WL, Araújo AJ, Cavalheiro AJ. An HPLC-PAD method to analyse flavonoid glycosides and styrylpyrones from *Cryptocarya* species (Lauraceae). *Phytochem Anal.* 2005; 16(2): 93-7.
77. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 78-85.

78. Zuber P, Nakano MM, Kajfasz JK, Lemos JA. Disruption of the adh (Acetoin Dehydrogenase) operon has wide-ranging effects on *Streptococcus mutans* growth and stress response. *J Bacteriol.* 2022; 204(3): e0057821.
79. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 13(5): 10.
80. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Bonifacio BV, Lopez-Ribot JLL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019; 52(1): 1-6.
81. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 2020; 28(8): 668-81.
82. Pereira R, Fontenelle ROS, Brito EHS, Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol.* 2021; 131(1): 11-22.
83. Zhang Q, MA Q, Wang Y, Wu H, Zou J. Molecular mechanisms of inhibiting glucosyltransferases for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Int J Oral Sci.* 2021; 13: 30.
84. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1): 199.
85. Owusu-Boadi E, Essuman MA, Mensah G, Ayimbissa EA, Boye A. Antimicrobial activity against oral pathogens confirms the use of *Musa paradisiaca* fruit stalk in ethnodentistry. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021; 2021: 8663210.
86. Abbas T, Sara B, Shoaib A. In vitro antimicrobial activity of plant fractions against major respiratory pathogens. *Park J Pharm Sci.* 2020; 33(6): 2557-65.
87. Ivanov M, Kannan A, Stojkovic D, Glamoclija J, Grdadolnik SG, Sanglard D et al. Revealing the astragalín mode of anticandidal action. *EXCLI J.* 2020; 29(19): 1436-45.
88. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, Sales Leite L, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *J Oral Microbiol.* 2019; 11(1): 1581520.
89. Martonaro-Fernandes L, Brito ACM, Araújo ECF, Almeida LFD, Wei XQ, Williams DW. Epithelial responses and *Candida albicans* pathogenicity are enhanced in the presence of oral streptococci. *Braz Dent J.* 2023; 34(3): 73-81.

90. Khoury ZH, Vila T, Puthran TR, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Melo MAS et al. The role of *Candida albicans* secreted polysaccharides in augmenting *Streptococcus mutans* adherence and mixed biofilm formation: in vitro and in vivo studies. *Front Microbiol.* 2020; 28(11): 307.
91. Lueyar TK, Karygianni L, Attin T, Thurnheer T. Dynamic interactions between *Candida albicans* and different streptococcal species in a multispecies oral biofilm. *Microbiologyopen.* 2023; 12(5): e1381.
92. Domingues N, Ramos LP, Pereira LM, Santos PBRE, Scorzoni L, Pereira TC et al. Antimicrobial action of four herbal plants over mixed-species biofilms of *Candida albicans* with four different microorganisms. *Aust Endod J.* 2023; 49(2): 262-71.
93. Garcia LGS, Rocha MG, Freire RS, Nunes PIG, Nunes JVS, Fernandes MR et al. Chitosan microparticles loaded with essential oils inhibit duo-biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *J Appl Oral Sci.* 2023; 31: e20230146.
94. Longhin EM, Yamani NE, Rundén-Pran E, Dusinska M. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Front Toxicol.* 2022; 28: 981701.
95. Drago L, Agrappi S, Bortolin M, Toscano M, Romanò CL, Vecchi E. How to study biofilms after microbial colonization of materials used in orthopaedic implants. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(3): 293.
96. Powell LC, Adams JYM, Quorashi S, Py C, Oger A, Gazze Sa et al. Alginate oligosaccharides enhance the antifungal activity of nystatin against candidal biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 31: 1122340.
97. Hac-Wydro K, Dynarowicz-Latka P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers--the role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophys C.* 2006; 123(2-3): 154-61.
98. Chien ALT, Phie AHL. Styrylpyrone derivative induces apoptosis through the up-regulation of Bax in the human breast cancer cell line MCF-7. *J Biochem Mol Biol.* 2003; 36(3): 269-74.
99. Mosaddik MA, Haque ME. Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniotalamin isolated from *Bryonopsis laciniata*. *Phytother Res.* 2003; 17(10): 1155-7.
100. Chan KM, Rajab NF, Siegel D, Din LB, Ross D, Inayat-Hussain SH. Goniotalamin induces coronary artery smooth muscle cells apoptosis: the p53-dependent caspase-2 activation pathway. *Toxicol Sci.* 2010; 116(2): 533-48.
101. Al-Qubaisi M, Rozita R, Yeap SK, Omar AR, Ali AM, Alitheen NB. Selective cytotoxicity of goniotalamin against hepatoblastoma HepG2 cells. *Molecules.* 2011; 16(4): 2944-59.

102. Souza ACS, Fatima A, Silveira RB, Justo G. Seek and destroy: the use of natural compounds for targeting the molecular roots of cancer. *Curr Drug Targets*. 2012; 13(8): 1072-82.
103. Semprebon SC, Fatima A, Lepri SR, Sartori D, Ribeiro LR, Mantonavi MS. (S)-Goniothalamine induces DNA damage, apoptosis, and decrease in BIRC5 messenger RNA levels in NCI-H460 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2014; 33(1): 3-13.
104. Herath HMPD, Preston S, Jabbar A, Garcia-Bustos J, Addison RS, Hayes S et al. Selected  $\alpha$ -pyrones from the plants *Cryptocarya novoguineensis* (Lauraceae) and *Piper methysticum* (Piperaceae) with activity against *Haemonchus contortus* in vitro. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2019; 9: 72-9.
105. Martins CVB, Resende MA, Silva DL, Magalhães TFF, Modolo LV, Pilli RA et al. In vitro studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers. *J Appl Microbiol*. 2009; 107(4): 1279-86.
106. 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(11): 925-30.
107. Dzoyem JP, Hamamoto H, Ngameni B, Ngadjui BT, Sekimizu K. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. *Drug Discov Ther*. 2013; 7(2): 66-72.
108. Ferreira AR, Alves DDN, Castro RD, Perez-Castillo Y, Sousa DP. Synthesis of coumarin and homoisoflavonoid derivatives and analogs: the search for new antifungal agents. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; 15(6): 712.
109. Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemde RT. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: a review. *J Mycol Med*. 2017; 27(1): 1-19.
110. Andrade ACM, Rosalen PL, Freires IA, Scotti L, Scotti MT, Aquino SG et al. Antifungal activity, mode of action, docking prediction and anti-biofilm effects of (+) - $\beta$ - pinene Enantiomers against *Candida* spp. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18(29): 2481-90.

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos a partir desta data**

**(Direitos de publicação reservados ao autor)**

**Araraquara, 26 de fevereiro de 2024.**

**Jonatas Silva de Oliveira**