



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**THIARA KARINE DE ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DA *GUAPIRA GRACILIFLORA* MART. (JOÃO-MOLE)**

**CAMPINA GRANDE  
2014**

**THIARA KARINE DE ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DA *GUAPIRA GRACILIFLORA* MART. (JOÃO-MOLE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy  
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto G. Barboza

**CAMPINA GRANDE  
2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa quanto a forma eletrônica. Sua produção total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A663a Araújo, Thiara Karine de.

Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano e da atividade antiproliferativa da *Guapira Graciliflora* Mart. (joão-mole) [manuscrito] / Thiara Karine de Araújo. – 2014.

77 f. il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2014.

“Orientação: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy, Departamento de Odontologia”.

“Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barbosa, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte”.

1. Odontologia. 2. *Guapira Graciliflora* Mart. 3. Antimicrobiano. 4. Plantas Medicinais. 5. Infecções Orais. I. Título.


21. ed. CDD 617.6

THIARA KARINE DE ARAÚJO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA  
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA *GUAPIRA GRACILIFLORA* MART.  
(JOÃO MOLE).

DATA DA DEFESA: 28/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Carlos Augusto Calvão Barboza  
Examinador Externo (UFRR)

  
Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves  
Examinadora Interna (UFRR)

  
Prof. Dr. Gustavo Pina Gódy  
Orientador e Presidente da Banca (UFRR)

Aos meus queridos pais, **Genival e Rita**,  
exemplos de retidão e perseverança,  
responsáveis por tudo que sou hoje, sempre  
acreditando em mim e em meus sonhos, a  
você tudo de maravilhoso na vida.  
A meu amado marido, **Ticiano**, companheiro  
de uma vida, pelo apoio, dedicação e palavras  
de incentivo em todos os momentos dessa  
caminhada.  
A meu querido irmão, **Túlio**, por sempre me  
incentivar e me fazer ver a vida da melhor  
perspectiva.  
A minha Vó, **Célia**, exemplo de amor a  
educação e ao saber, mostrou-me desde cedo  
que não há limites quando se tem vontade.  
*DEDICO ESTA CONQUISTA*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy, um grande exemplo de competência, professor e pesquisador, que desempenhou papel fundamental na minha formação e qualificação profissional. Agradeço o privilégio de ser sua orientanda mais uma vez, agradeço todas as oportunidades que você me proporcionou e a confiança em mim depositada.*

*Obrigada pelo carinho e conselhos dados, pela segurança e objetividade com que transmitiu seus conhecimentos, tornando a experiência do mestrado mais prazerosa e produtiva.*

*Sou muito grata por tudo, principalmente pelo engrandecimento profissional e pessoal que a nossa convivência me proporcionou. Saiba que lhe tenho imenso respeito, admiração e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, força que nos conduz e nos impulsiona a seguir em frente mesmo nos momentos de adversidade. Obrigada por ter sido meu grande confidente nas horas de dificuldades. "Tudo posso naquele que me fortalece" (Fp 4.13)".

Aos meus pais **Genival e Rita**, que realizaram de forma exemplar e completa a tarefa de me orientar pelos caminhos da verdade, da honestidade e do respeito ao próximo. Divido com vocês os louros desse momento, vocês são os reais responsáveis por minhas conquistas, obrigada por tudo que sou, pela família que tenho e pela vontade de lutar por meus objetivos. Desejo a vocês tudo de melhor na vida. Obrigada. A vocês meu eterno amor!

A meu marido **Ticiano**, grande amor da minha vida, companheiro de uma longa jornada. Obrigada pelo apoio, pela paciência e por ter suportado todas as ausências. Agradeço por nunca me deixar esmorecer diante dos problemas, sempre me motivando com palavras de incentivo. Obrigada pelo companheirismo, pelo amor e pela amizade.

A meu irmão **Túlio**, por ter sido um dos meus maiores incentivadores. Agradeço pelo carinho dedicado a mim e por todas as alegrias que dividimos juntos.

A todos os meus **familiares**, pelo apoio e incentivo. Pelas orações e pela torcida.

Aos professores **Dra. Pollianna Alves e Dr. Cassiano Nonaka**, por participarem de forma direta e fundamental na minha formação como mestre. Agradeço pela atenção, disponibilidade e dedicação com que sempre me atenderam. A vocês meus sinceros agradecimentos, minha admiração e respeito.

Ao **Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza**, do Departamento de Morfologia da UFRN, por possibilitar a realização de parte dessa pesquisa no laboratório de cultura de células, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de grande aprendizado para minha vida profissional. Agradeço a receptividade e o carinho.

A doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFRN, **Fernanda Ginani**, por toda ajuda, paciência e sabedoria compartilhadas; pela valiosa e fundamental contribuição na realização dessa pesquisa. Obrigada pela atenção, carinho e pela amizade que surgiu entre nós. Agradeço por me mostrar que conhecimento dividido é conhecimento multiplicado.

A todos que fazem o **LABDEM**, especialmente a **Prof. Dra. Ana Cláudia**, pelos conhecimentos transmitidos e pelos agradáveis momentos de convivência.

A todos os **colegas do laboratório de Biopolímeros da UFRN**, em especial ao **Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha**, pelos conhecimentos compartilhados e por terem me recebido de forma tão gentil.

Aos meus **colegas**, companheiros de jornada, por tudo que vivemos juntos. Pelas alegrias, tristezas, aflições e euforias. Sentirei saudades, mas saibam que os levarei comigo guardados em um lugar muito especial.

Aos demais **professores** do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

A **UEPB**, por mais uma vez me proporcionar uma formação de qualidade.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD)** pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste trabalho.

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*

Cora Coralina



## RESUMO

As plantas têm sido uma rica fonte de agentes terapêuticos, servindo de base para síntese de fármacos, constituindo importante fonte de novos medicamentos para doenças que continuam sem cura como infecções e neoplasias malignas, nesse contexto a flora brasileira, por sua diversidade, desempenha papel importante na descoberta de potenciais drogas antimicrobianas e antitumorais. O presente trabalho se propôs a avaliar o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcolico da *Guapira Graciliflora* Mart. (EOHG) através do método da microdiluição em caldo frente a cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans*, sua capacidade antiproliferativa em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas SCC 9, SCC 25 e HSC 3 pelo ensaio MTT, além de seu potencial indutor de apoptose observado pelo teste da coloração anexina V/PI. O EOHG apresentou atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados, os melhores resultados foram observados nas bactérias *S. mutans* (12,50 µl/ µl), *S. mitis* (12,50 µl/ µl) e *S. salivarius* (6,25 µl/ µl), e nas cepas clínicas de *Candida albicans* (11) e *Candida albicans* (410), com CIMs de 0,5mg/ml e 2mg/ml, respectivamente. O EOHG, na concentração de 200 µg/ml, apresentou taxas de inibição de 49% para as células SCC9 e 63% para as células HSC3 no intervalo de 48h. A taxa de apoptose celular para HSC 3 foi de 19,29% no período de 48h, adicionalmente o teste da anexina V/PI revelou indução de apoptose celular, sugerindo que houve danos a membrana celular e nuclear. Com base nos resultados apresentados, a *Guapira Graciliflora* Mart. representa uma potencial fonte de compostos bioativos a serem utilizados no tratamento das infecções orais e do CCEO.

**Palavras-chave:** *Guapira Graciliflora* Mart. Antimicrobiano. Plantas Mediciniais. Infecções Oraís. Anticâncer. Apoptose. SCC9. SCC25. HSC3.

## ABSTRACT

The plants have been a rich source for therapeutic agents, serving as basis for the drug's synthesis, making an important source of new medicines for diseases that are yet without cure like infections and malignancies, in this context the Brazilian flora, due its diversity, plays an important role in the discovery of potential antimicrobial drugs and antitumor. This work proposes to evaluate the antimicrobial potential of the hydroalcoholic extract of the *Guapira Graciliflora* Mart. (EOHG) through the method of the microdilution in broth against strains of the *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mitis* and *Candida albicans*, its antiproliferative capacity in cell lines of squamous cell carcinoma SCC 9, SCC 25 e HSC 3 by the essay MTT, additional to its inducer potential of apoptosis observed by the test of annexin V/PI. The EOHG has presented antimicrobial activity over tested microorganisms, and the better results was observed in the bacteria *S. mutans* (12,50  $\mu$ l/  $\mu$ l), *S. mitis* (12,50  $\mu$ l/  $\mu$ l) and *S. salivarius* (6,25  $\mu$ l/  $\mu$ l), and in the clinical strains of *Candida albicans* (11) and *Candida albicans* (410), with CIMs of 0,5mg/ml and 2mg/ml, respectively. The EOHG, in the concentration of 200  $\mu$ g/ml, have presented inhibition rates of 49% for the cells SCC9 and 63% for the cells HSC3 in the interval of 48h. The Rate of cellular apoptosis for HSC 3 was 19,29% on the time of 48h, additionally the tests of the annexin V/PI has revealed the induction of the cellular apoptosis, suggesting that the cellular membrane and nuclear have been damaged. Based in the results that have been presented, the *Guapira Graciliflora* Mart. is elected as a potential source of bioactive compound to be used in the treatment of oral infections and the CCEO.

**Keywords:** Anti-Infective Agents. Antineoplastic Agents. Apoptosis. Medicinal Plants. *Guapira Graciliflora* Mart.

## LISTA DE SIGLAS

ACAM	Arruda Câmara
ATCC	Do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CCEOL	Carcinoma de Células Escamosas Oral de Língua
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EHO	Extrato Hidroalcolico da <i>Guapira Graciliflora</i> Mart.
EHO LG	Extrato Hidroalcolico Liofilizado da <i>Guapira Graciliflora</i> Mart.
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
HSC	Do inglês <i>Human Oral Squamous Cell Carcinoma with High Metastatic Potential</i>
LABDEM	Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos
MDC	Microdiluição em Caldo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
PA	Pró Análise
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Iodeto de Propídeo
PROCAD	Programa Nacional de Cooperação Acadêmica
SCC	Do inglês <i>Squamous Cell Carcinoma</i>
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Visão geral da <i>Guapira Graciliflora</i> Mart. e folhas da <i>Guapira Graciliflora</i> Mart. ....	18
Figura 2 -	Processamento do material vegetal .....	18
Quadro 1 -	Linhagens celulares de carcinoma de células escamosas utilizadas .....	23
Figura 3 -	Ensaio de MTT: redução do sal de MTT e leitura das microplacas .....	25
<b>Artigo 1</b>		
Tabela 1 -	Valores da CIM ( $\mu$ l/ $\mu$ l) para o extrato de <i>Guapira Graciliflora</i> Mart. sobre os microrganismos avaliados .....	37
Tabela 2 -	Valores da CIM (mg/ml) para o EHOg sobre microrganismos avaliados. ....	38
Figura 1 -	Concentração de compostos fenólicos totais, proteína e açúcares totais do EHOg .....	38
<b>Artigo 2</b>		
Figura 1 -	Efeito do extrato sobre as linhagens de CCEO correlacionando concentração com valores de absorvância. Os valores inerentes ao crescimento normal celular (controle negativo) e a ação da Cisplatina (controle positivo) são apresentados no gráfico .....	41
Tabela 1 -	Taxas de inibição de crescimento sobre as linhagens de CCE desempenhadas pelo extrato, em diferentes concentrações, e pela Cisplatina em intervalos de tempo de 48 e 72 horas em comparação com o controle negativo .....	42
Figura 2 -	Taxas de apoptose em células HSC3 tratadas com EOHg a 200 $\mu$ g/ml durante 48 e 72h (C1 e C2). Os gráficos A1 e A2 tratam do controle negativo, B1 e B2 se referem ao controle positivo .....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	17
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO .....	17
3.3	LOCAL DO ESTUDO .....	17
3.4	MATERIAL VEGETAL .....	17
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO .....	18
3.6	CARACTERIZAÇÃO FITO QUÍMICA .....	19
<b>3.6.1</b>	<b>Compostos fenólicos totais</b> .....	<b>19</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Dosagem de proteína</b> .....	<b>19</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Açúcares totais</b> .....	<b>19</b>
3.7	CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO .....	19
<b>3.7.1</b>	<b>Microrganismos</b> .....	<b>19</b>
3.7.1.1	Bactérias .....	19
3.7.1.2	Levedura .....	20
<b>3.7.2</b>	<b>Meios de cultura</b> .....	<b>20</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Preparo do inóculo</b> .....	<b>20</b>
3.7.3.1	Bactérias .....	20
3.7.3.2	Levedura .....	20
<b>3.7.4</b>	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Micro diluição</b> .....	<b>21</b>
3.7.4.1	Leitura dos Resultados da CIM .....	21
<b>3.7.4.1.1</b>	<b>Bactérias</b> .....	<b>21</b>
<b>3.7.4.1.2</b>	<b>Levedura</b> .....	<b>22</b>
<b>3.7.5</b>	<b>Determinação da Concentração Bactericida (CBM) ou Fungicida Mínima (CFM)</b> .....	<b>22</b>
3.8	CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO E INDUTOR DE APOPTOSE .....	22
<b>3.8.1</b>	<b>Linhagens Celulares</b> .....	<b>22</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Cultivo celular</b> .....	<b>23</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Plaqueamento celular</b> .....	<b>24</b>
<b>3.8.4</b>	<b>Preparação das amostras</b> .....	<b>24</b>
<b>3.8.5</b>	<b>Ensaio de proliferação com MTT</b> .....	<b>25</b>
<b>3.8.6</b>	<b>Avaliação da viabilidade e morte celular por Anexina V-FITC/ Iodeto de Propídeo</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	<b>27</b>
4.1	APRESENTAÇÃO .....	27
4.2	ARTIGO 1 A SER SUBMETIDO .....	27
4.3	ARTIGO 2 A SER SUBMETIDO .....	39
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
	<b>ANEXO A - Normas e submissão de artigo no periódico BMC Complementary and Alternative Medicine</b> .....	<b>59</b>
	<b>ANEXO B – Normas e submissão de artigo no periódico Molecules</b> .....	<b>69</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana, sendo comum a comercialização de plantas medicinais em feiras livres, mercados populares e quintais de residências. Ao longo dos anos foram identificadas diversas formas de apresentação: chás, sucos, xaropes, compressas, inalações, banhos, pomadas, gargarejos e bochechos (REZENDE; COCCO, 2002; FRANÇA et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2010; CEOLIN et al, 2011; PERAZZO et al, 2012).

As plantas representam para os seres humanos importante fonte de nutrientes, desempenhando papel significativo na manutenção da saúde e na melhora da qualidade de vida das pessoas. Não há dúvidas que a ingestão de vegetais é um dos métodos mais práticos, eficazes e baratos para prevenção de doenças (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; DESOTI et al, 2011; NIELSEN et al, 2012; DZOYEM et al, 2013).

Durante muitos séculos, as plantas têm sido uma rica fonte de agentes terapêuticos, servindo de base para síntese de fármacos. Apesar do desenvolvimento das drogas sintéticas, atualmente 75% dos medicamentos prescritos em todo mundo são derivados de vegetais, mostrando que as plantas constituem importante fonte de novos medicamentos para doenças, inclusive aquelas que continuam sem cura (TAN et al, 2006; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; RAMOS et al, 2008; MAHATA et al, 2012).

O Brasil vem destaca-se por possuir um terço da flora mundial, além da Amazônia representar a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. Esta intensa diversidade faz com que as pesquisas e o próprio desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos no Brasil possam ocorrer como destaque no cenário científico mundial (MEDEIROS; CABRAL, 2001; FRANÇA et al, 2008; SANTOS et al, 2011).

As doenças orais são um problema de saúde pública mundial, sendo a cárie dental e a doença periodontal os agravos de saúde bucal mais prevalentes na humanidade (HERRERA et al, 2014). Estas condições são resultado de uma pobre higiene oral e do acúmulo de biofilme na superfície dos dentes e tecidos moles (CHEON et al, 2013; MARREIRO et al, 2014), o que aumenta a resistência dos microrganismos presentes aos agentes antibióticos utilizados (VAHABI et al, 2011; KANAGUCHI et al, 2012; JYOTHI; SESHAGIRI, 2012; MARREIRO et al, 2014).

Além dos microrganismos relacionados a cárie e a doença periodontal, destaca-se também a presença na cavidade oral da *Candida albicans*, levedura oportunista frequentemente identificada em estomatites por prótese e candidose oral (ALVES et al, 2009; SARDI et al, 2011; SHIN et al, 2013).

Dada a incidência das doenças bucais e o aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos, surge a necessidade de opções de tratamentos alternativos seguros, eficazes e econômicos. É nesse contexto, que as plantas medicinais aparecem como opções promissoras no tratamento das doenças infecciosas orais, sendo consideradas um importante reservatório de novas substâncias antimicrobianas a serem usadas no desenvolvimento de medicamentos de interesse odontológico (MOTHANA et al, 2009; ASSOBB et al, 2011; NIELSEN et al, 2012; TALIB et al, 2012; VIOLANTE et al, 2012; DZOYEM et al, 2013; OLIVEIRA et al, 2013).

Assim como a cárie e a doença periodontal, o câncer de cavidade oral é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. A última estimativa mundial apontou que ocorreriam cerca de 300 mil casos novos e 145 mil óbitos por câncer de boca e lábio para o ano de 2012; desses, cerca de 80% ocorreriam em países em desenvolvimento (INCA, 2014). Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

O carcinoma de células escamosas (CCE) representa a neoplasia mais frequente da cavidade oral, caracterizada como uma doença multifatorial de alta incidência mundial, com taxas de morbidade e mortalidade altas, apresentando sobrevida menor do que outros tipos de carcinoma (DAHER; PEREIRA; OLIVEIRA, 2008; MARTINS et al, 2008; RIBEIRO et al, 2009; HASSON et al, 2008; ORTHOLAN et al, 2009; YEH et al, 2012; WU et al, 2013). O tratamento convencional resulta da combinação de procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia, no entanto a quimioterapia não apresenta bons resultados frente ao CCEO refletindo em um mau prognóstico para a doença (YANG et al, 2011; YEH et al, 2012; WU et al, 2013). Dessa forma, é de extrema importância a necessidade de desenvolvimento de novos e eficazes agentes quimioterápicos para o CCEO.

As mitocôndrias desempenham um papel central em vários processos fisiopatológicos de células tumorais, em particular na apoptose. A maioria dos fármacos antitumorais podem induzir a apoptose nos diferentes tipos de células tumorais, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca, culminando na ativação das caspases efetoras (LUO et al, 2014). Os produtos naturais, dentre eles as plantas, constituem rica fonte de compostos a serem

utilizados na terapia anticâncer (YANG et al, 2013; WU et al, 2013), sendo o potencial antitumoral de extratos e compostos vegetais atribuído à sua capacidade moduladora das vias de sinalização de apoptose (AMIN et al, 2009; MEHTA et al, 2010; NEERGHEEN et al, 2010).

A *Guapira Graciliflora* Mart. pertence à família Nyctaginacea tendo como sinonímia científica *Pisonia graciliflora* Mart. ex J. A. Schmidt; e *Pisonia graciliflora* Mart. var. *B. subferruginosa* Mart., popularmente é conhecida como João-mole, pau-mole, João dormindo (LORENZI, 1998), pau-piranha (COELHO et al, 2005).

A madeira é indicada para instrumentos agrícolas, caixotaria e confecção de brinquedos, bem como para lenha e carvão. O João-mole é empregado na composição de reflorestamentos heterogêneos destinados à recuperação da vegetação em áreas degradadas, seus frutos são muito apetecidos por diversas espécies de pássaros (LORENZI, 1998; AQUINO et al, 2007) e por alguns mamíferos (ALVES-COSTA, ETEROVICK, 2007).

O João-mole aparece na Caatinga, principal bioma do semiárido brasileiro, que oferece uma grande variedade de recursos vitais para a sobrevivência da população local (CHAVES et al, 2013), sendo referenciado como medicinal pela população nativa dessa área (AGRA et al, 2008; SIQUEIRA et al, 2012). Estudos revelaram que a *Guapira Graciliflora* Mart. apresentou atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (COSTA et al, 2010; ROCHA et al, 2013), no entanto os testes realizados em *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* e *Candida krusei* não demonstraram ação antifúngica (CHAVES et al, 2013).

A importância em avaliar o potencial farmacológico e químico da *Guapira Graciliflora* Mart., presente na Caatinga do Nordeste brasileiro, reside não apenas na busca por novas substâncias oriundas das plantas, mas também na apreciação ecológica da região, uma vez que o conhecimento das espécies vegetais dessa área permitirá a proposição de planos para conservação do bioma estimulando o uso sustentável das plantas exploradas.

O tratamento do câncer e das infecções têm atraído a atenção e o interesse de pesquisadores, em virtude do grande impacto dessas doenças na saúde da população mundial. O surgimento de microrganismos resistentes requer o estabelecimento de terapias alternativas a base de novos antimicrobianos adequados ao uso em seres humanos.

O potencial antitumoral de extratos e compostos vegetais pode ser atribuído à sua capacidade em induzir mudanças na regulação dos alvos moleculares nas vias de transdução do sinal oncogênico, implicados no crescimento e replicação das células, na apoptose, na angiogênese, na invasão e metástase das células tumorais (AMIN et al, 2009; MEHTA et al,



2010; NEERGHEEN et al, 2010); representando para os pacientes com CCEO a alternativa de uma nova terapêutica mais eficaz.

O presente estudo teve como objetivo avaliar, através de experimentos *in vitro*, o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas da *Guapira Graciliflora* Mart. frente a microrganismos envolvidos em doenças infecciosas orais, bem como seu provável efeito antiproliferativo em linhagens de carcinoma de células escamosas orais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através de experimentos *in vitro*, a atividade antimicrobiana e atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas da *Guapira Graciliflora* Mart.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato por meio da determinação das concentrações mínimas inibitória (CIM), bactericida (CBM) e fungicida (CFM) mínima contra microrganismos orais (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans*);
- b) Verificar a capacidade do extrato vegetal em induzir morte celular por apoptose nas linhagens celulares de CCEOL SCC9, SCC25 e HSC3.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho não necessitou de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Foram utilizadas cepas estabelecidas de microrganismos disponíveis no LABDEM, três linhagens celulares imortalizadas e produtos comercialmente disponíveis. Todos os procedimentos de biossegurança foram adotados nas diversas etapas experimentais do estudo, garantindo a integridade física dos pesquisadores envolvidos.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo caracterizou-se como uma investigação experimental *in vitro*.

#### 3.3 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM) do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB, e no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN.

#### 3.4 MATERIAL VEGETAL

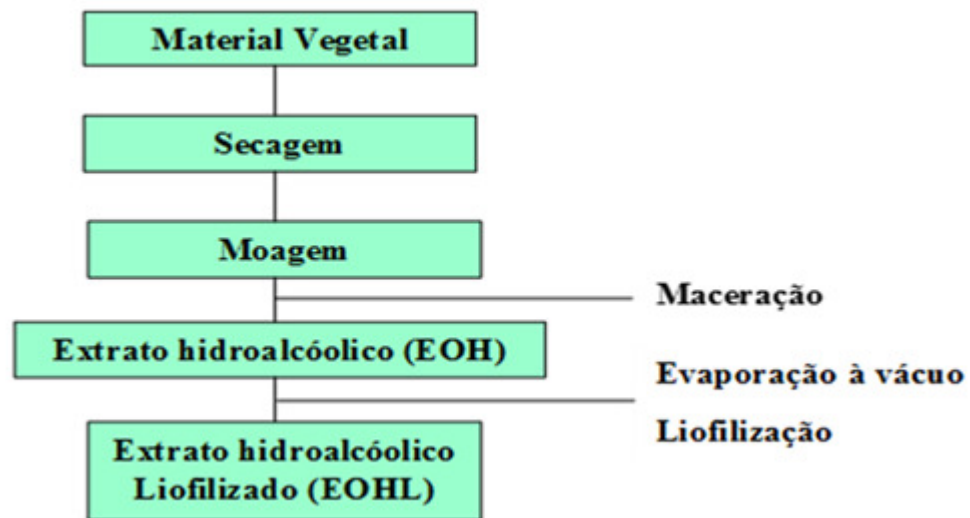
As folhas da *Guapira Graciliflora* Mart. foram coletadas na região do semiárido paraibano, no município de Queimadas, na meso região da Borborema e micro região do Cariri Oriental, no mês de agosto de 2013 (Figura 1). O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa de ar circulante (FANEM®, modelo 330) a temperatura de 40°C até obtenção de peso constante. O espécime testemunho da *Guapira Graciliflora* Mart. encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba sob o registro n° 907/ ACAM.

Figura 1 - Visão geral da *Guapira Graciliflora* Mart. e folhas da *Guapira Graciliflora* Mart.



### 3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Figura 2 – Processamento do material vegetal



Como apresentado no esquema da Figura 2, o extrato hidroalcolico a 50% das folhas foi obtido através do processo de maceração por cinco dias, em temperatura ambiente e protegido da luz, utilizando uma proporção de 200g de planta seca moída para 1L do solvente. Após esse processo, o extrato foi acondicionado em recipiente de vidro âmbar e armazenado a temperatura ambiente protegido da luz solar. Para a retirada do solvente, utilizou-se evaporador rotativo (Quimis® / Q344M) a 40°C com bomba de vácuo, em seguida o extrato foi liofilizado (Labconco® / Freezezone 4.5).

## 3.6 CARACTERIZAÇÃO FITO QUÍMICA

### 3.6.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927). A leitura foi realizada a 765 nm em espectrofotômetro (Femto 600S).

### 3.6.2 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada usando-se o reagente Bradford (BRADFORD, 1976). A Albumina Sérica Bovina foi utilizada como padrão. A leitura foi realizada a 595 nm em leitor de microplacas (Epoch, Biotek<sup>®</sup>, Gen5 Data Analysis Software).

### 3.6.3 Açúcares totais

A quantificação de açúcares foi determinada pelo método de Dubois através da formação de compostos fufural a partir da desidratação dos açúcares por ácido sulfúrico (P.A.) (DUBOIS et al, 1956). A leitura foi realizada a 490 nm em espectrofotômetro (Femto 600)

## 3.7 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

### 3.7.1 Microrganismos

#### 3.7.1.1 Bactérias

As bactérias utilizadas no estudo foram selecionadas considerando-se a composição microbiana dos biofilmes orais e os principais microrganismos relacionados à cárie, gengivite e outras infecções da cavidade oral. Foram elas: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (7073), *Streptococcus oralis* (ATCC 1055), *Streptococcus parasanguinis* (903) e *Streptococcus mitis* (ATCC 49456).

### 3.7.1.2 Levedura

A levedura *Candida albicans* (ATCC 18804) e duas cepas clínicas de *Candida Albicans* (11, 410), obtidas da coleção do Laboratório de Pesquisas Antimicrobianas da Universidade Estadual da Paraíba, foram inseridas no estudo devido a sua coparticipação na formação do biofilme dental e sua relação com doenças orais, como a candidose.

### 3.7.2 Meios de cultura

Para manutenção dos microrganismos, foi utilizado o meio de cultura Brain Heart Infusion Agar (BHI Ágar) para bactérias e o Ágar Sabouraud Dextrose para manutenção da levedura *C. albicans*. Para os testes de atividade antimicrobiana, foi utilizado o meio BHI caldo para bactérias e o Sabouraud Dextrose caldo para leveduras *C. albicans*.

### 3.7.3 Preparo do inóculo

#### 3.7.3.1 Bactérias

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram realizados através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M07-A8 para bactérias (CLSI, 2009).

Culturas de bactérias em incubadora foram preparadas no período de 18-24 horas e adicionadas em solução salina estéril (5 mL), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 625 nm, originando uma concentração equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se, ao final, uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, sendo, desta última solução, 1 mL adicionado em 500  $\mu$ L de meio de cultura específico, estabelecendo-se uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução resultou em uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

#### 3.7.3.2 Levedura

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008).

Culturas de leveduras de 24 horas foram preparadas e adicionadas em solução salina estéril (5 mL), ajustando-se sua absorvância entre 0,08 a 0,10 a 530 nm, originando uma concentração equivalente a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL. A partir disso, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se, ao final da mesma, uma concentração de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL, sendo, desta última solução, 1 mL adicionado em 9 mL de meio de cultura específico, homogeneizados e novamente adicionados em 9 mL do meio de cultura, estabelecendo-se uma concentração de  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução final resultou em uma concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

#### **3.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Microdiluição**

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços (8 linhas A-H/ 12 colunas), foram depositados 100 µL dos meios de cultura supracitados. Em seguida, acrescentou-se 100 µL do extrato nas devidas colunas, sendo realizada, posteriormente, a microdiluição, onde 100 µL do conteúdo do primeiro poço foi homogeneizado e transferido para o seguinte, repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a se obter concentrações entre 15,62 e 2.000 µg/mL do extrato. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 100 µL do inóculo do microrganismo a ser avaliado, de crescimento recente, foram adicionados. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera aeróbia ou microaerofilia, dependendo da exigência do microrganismo (CLSI, 2008; CLSI, 2009).

Foram incluídos nos testes a clorexidina (Sigma-Aldrich®) e a nistatina (Sigma-Aldrich®), como controle para comparação da atividade antimicrobiana do material vegetal testado. Para verificar o controle do crescimento do microrganismo e a esterilidade do meio de cultura, bem como, do material vegetal testado, os mesmos foram colocados de forma individualizada nas microplacas.

##### **3.7.4.1 Leitura dos Resultados da CIM**

###### **3.7.4.1.1 Bactérias**

Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL da solução de resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich®). A CIM foi definida como a menor concentração da amostra capaz

de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória (CLSI, 2009).

#### *3.7.4.1.2 Levedura*

Após o período de incubação, observou-se no fundo da cada poço a formação ou não de colônias através de inspeção visual.

### **3.7.5 Determinação da Concentração Bactericida (CBM) ou Fungicida Mínima (CFM)**

Para determinar a atividade bactericida ou fungicida, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio BHI Ágar (bactérias) e Ágar Sabouraud Dextrose (levedura), e incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias e 48 horas para fungos. As CBM/CFM foram definidas como a menor concentração que inibiu crescimento visível no meio utilizado.

## **3.8 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO E INDUTOR DE APOPTOSE**

### **3.8.1 Linhagens Celulares**

Foram utilizadas para este estudo três linhagens celulares comerciais derivadas de carcinoma de células escamosas de língua humano: SCC9 e SCC25 da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), e HSC 3 (JCRB0623) da Health Science Research Resources Bank (Japan Health Sciences Foundation) como mostrado no Quadro 1. As linhagens foram gentilmente cedidas pelo Programa de Pós-Graduação em Estomatologia - FOP-UNICAMP e cultivadas como recomendado pelos fornecedores.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Bioquímica de Centro de Biociências da UFRN.



Quadro 1 - Linhagens celulares de carcinoma de células escamosas utilizadas

Linhagem Celular	Organismo	Tecido	Doença	Idade	Sexo
SCC 9	Homo sapiens, humano	Língua	Carcinoma de Células Escamosas	25	M
SCC 25	Homo sapiens, humano	Língua	Carcinoma de Células Escamosas	70	M
HSC 3	Homo sapiens, humano	Língua	Carcinoma de Células Escamosas Metastático	64	M

### 3.8.2 Cultivo celular

As células foram descongeladas e mantidas em fracos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (BD, USA), com meio Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM/F-12; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil), 400 ng/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) e 1% de solução antibiótico-antimicótico (GIBCO, USA) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura adotado pelo Laboratório de Cultura Células do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFRN. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (NIKON – CF160, Japan) e o meio de cultura trocado a cada 48 horas.

Após atingirem a subconfluência, as células foram submetidas ao subcultivo: o meio de cultura foi removido do frasco e a monocamada celular lavada com solução fosfato-alcalina, sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7,2 e em seguida incubada com 1 mL de solução de tripsina EDTA a 0,25% (1:250) (Invitrogen) durante 3 a 5 minutos, a 37°C.

Após este intervalo a tripsina foi inativada pela adição de novo meio de cultura e as células em suspensão transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 ml e centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida foi aspirado o sobrenadante e o precipitado de células ressuspendido em 1 mL de meio de cultura. Alíquotas desta suspensão foram distribuídas em frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup> contendo 8 mL de meio de cultura e novamente levadas de volta à estufa, onde cada procedimento deste deu origem a uma nova passagem de linhagem celular.

Os grupos experimentais foram estabelecidos de acordo com o tipo de ensaio a ser realizado. Para analisar o efeito das amostras testadas na proliferação celular foi realizada a curva de proliferação celular utilizando o método colorimétrico MTT e avaliação da viabilidade e morte celular por anexina V-FITC/ iodeto de propídeo.

Para todos os ensaios supracitados o plaqueamento celular foi realizado 24h antes da aplicação das amostras (extrato). As células foram divididas em três grupos e submetidas aos diferentes tratamentos descritos a seguir:

- a) **Grupo controle negativo:** Não houve a aplicação de nenhuma substância nas células deste grupo, não obstante passarem por todos os processos pelos quais os grupos experimentais passaram;
- b) **Grupo controle positivo:** As células foram tratadas com 100  $\mu$ L de Cisplatina (1mg/mL; Blau<sup>®</sup>) na concentração de 5 $\mu$ M;
- c) **Grupo teste:** As células foram tratadas com 100  $\mu$ L da amostra nas concentrações testadas.

### 3.8.3 Plaqueamento celular

Para estabelecimento dos grupos experimentais, o processo de tripsinização foi repetido, a contagem do número de células foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. Após o cálculo padrão foi possível conhecer o número aproximado de células em 1 mL e, dessa forma, calcular o volume da suspensão celular utilizada em cada ensaio:

- a) Ensaio de proliferação com MTT: densidade de 5x10<sup>3</sup> células/poço em placas de 96 poços;
- b) Avaliação da viabilidade e morte celular por anexina V-FITC/ iodeto de propídeo: densidade de 2x10<sup>5</sup> células/poço em placas de 6 poços.

### 3.8.4 Preparação das amostras

Para realização dos testes, o EOHLG foi dissolvido em meio (DMEM/F-12; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na concentração 200  $\mu$ g/mL, a partir desta, as demais concentrações (100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/mL e 5  $\mu$ g/mL) foram estabelecidas.

### 3.8.5 Ensaio de proliferação com MTT

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983), que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazólio), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular. Em placas de 96 poços, foram colocadas  $5 \times 10^3$  células suspensas em 100  $\mu$ L DMEM/F-12 por poço. As placas foram incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) por um período de 24 h.

Após esse período, os meios foram aspirados e as células tratadas com 100  $\mu$ L/poço da amostra teste nas devidas concentrações (200  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL e 5  $\mu$ g/mL), além da Cisplatina (1mg/ml; Blau<sup>®</sup>) na concentração de 5  $\mu$ M. Nos intervalos de 24, 48 e 72h, foram utilizados 24 poços para cada grupo de células; as placas foram incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e o teste se procedeu nos referidos intervalos de tempo.

Figura 3 - Ensaio de MTT: redução do sal de MTT e leitura das microplacas



Após cada intervalo, o meio com os produtos testes de cada poço foram aspirados. A solução de MTT (1mg/mL de meio) foi preparada e adicionada a cada poço (100  $\mu$ L/poço), em seguida as placas foram incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) por 4h de forma a permitir o metabolismo do MTT. Em seguida, o meio foi aspirado, acrescentou-se 100 $\mu$ L/poço de álcool P.A para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas por cinco minutos e a leitura se procedeu em leitor de microplacas, conforme mostrado na Figura 3, com

comprimento de onda 570nm (Epoch, Biotek<sup>®</sup>, Gen5 Data Analysis Software), onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular.

### **3.8.6 Avaliação da viabilidade e morte celular por Anexina V-FITC/ Iodeto de Propídeo**

Para avaliar os efeitos das amostras testadas sobre a morte celular, foi utilizado o kit FITC/Annexin V Dead Cell Apoptosis Kit with FITC Annexin and PI, for Flow Cytometry (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA). O marcador anexina V-FITC permite detectar os estágios iniciais de apoptose devido ao fato de se ligar preferencialmente a fosfolipídios negativamente carregados (fosfatidilserina) expostos no início do processo apoptótico, enquanto o iodeto de propídeo (PI) permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular, por ser um marcador que interage com o DNA, mas não é capaz de atravessar a membrana plasmática, devido ao seu alto peso molecular. Assim, a marcação positiva para PI indica que há poros na membrana, fenômeno característico de processos de necrose ou estágio final de apoptose (KATARIA et al, 2013).

Para isso, as células foram cultivadas em triplicata, em placas de 6 poços na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço. Após 24, 48 e 72 horas de cultivo, as células foram tripsinizadas, coletadas e lavadas com tampão PBS gelado. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200  $\mu$ L de Binding Buffer. Foi adicionado 3  $\mu$ L de Annexin V – FITC e 1  $\mu$ L da solução de PI a 100  $\mu$ g/mL. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e mantidas sob proteção de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão de ligação para anexina V e as células foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences), medindo a emissão de fluorescência a 530 nm e 575 nm. A população foi separada em quatro quadrantes: células viáveis (baixos níveis de fluorescência), células apoptóticas (fluorescência verde) e células em necrose (fluorescência em verde e vermelho). Os dados foram analisados a partir do software FlowJo v. 7.6.3 (Tree Star, Inc.).

## 4 ARTIGOS

### 4.1 APRESENTAÇÃO

A presente pesquisa foi previamente apresentada e aprovada na qualificação desenvolvida pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB.

Como resultado de sua execução, dois artigos serão apresentados nessa dissertação:

- a) **Atividade antimicrobiana do extrato da *Guapira Graciliflora* Mart. contra microrganismos orais de interesse odontológico** - O referido artigo será submetido ao periódico *BMC Complementary and Alternative Medicine*, cujas normas de elaboração e submissão do manuscrito estão elencadas no Anexo A. O periódico *BMC Complementary and Alternative Medicine* possui fator de impacto 2,08 e *qualis* B1, de acordo com classificação da CAPES.
- b) **Efeito antiproliferativo e indução de apoptose em células de câncer oral pelo extrato da *Guapira Graciliflora* Mart** - O referido artigo será submetido ao periódico *Molecules*, cujas normas de elaboração e submissão do manuscrito estão elencadas no Anexo B. O periódico *Molecules* possui fator de impacto 2,428 e *qualis* A2, de acordo com classificação da CAPES.

### 4.2 ARTIGO 1 A SER SUBMETIDO

## **ANÁLISE FITOQUÍMICA E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA *GUAPIRA GRACILIFLORA* MART. CONTRA MICRORGANISMOS ORAIS DE INTERESSE ODONTOLÓGICO.**

Thiara Karine de Araújo<sup>1,2</sup>, Gustavo Pina Godoy<sup>1,3§</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, Campina Grande, Brasil

Todos os autores contribuíram para elaboração deste trabalho

<sup>§</sup> Autor Correspondente

Email:

TKA: thiarakarine@hotmail.com

GPG: gruiga@hotmail.com

## Resumo

### Introdução

O aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais, impulsiona a busca por novas fontes de substâncias antimicrobianas nas plantas medicinais. O presente estudo, avaliou o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcolico da *Guapira Graciliflora* Mart. (EOHG) contra microrganismos orais, bem como a análise fitoquímica desta planta.

### Métodos

A atividade antibacteriana e antifúngica foi avaliada através do método da microdiluição em caldo frente a linhagens bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mitis* e cepas de *Candida albicans*.

### Resultados

O extrato apresentou atividade antimicrobiana sobre todos microrganismos testados, sendo os melhores resultados observados nas bactérias *S. mutans* (12,50  $\mu$ l/  $\mu$ l), *S. mitis* (12,50  $\mu$ l/  $\mu$ l) e *S. salivarius* (6,25  $\mu$ l/  $\mu$ l), e nas cepas clínicas de *Candida albicans* (11) e (410), com CIMs de 0,5mg/ml e 2mg/ml, respectivamente. A análise fito-química revelou que extrato possui 3% de proteínas, 13% de açúcares totais e 17% de compostos fenólicos.

### Conclusão

Os resultados sugerem que a *Guapira Graciliflora* Mart. apresenta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos relacionados a patologias infecciosas orais.

**Descritores:** Antimicrobiano, Guapira Graciliflora, Plantas Mediciniais, Infecções Orais.

## Introdução

Doenças infecciosas são causadas por microorganismos patogênicos ou oportunistas, como bactérias, vírus, parasitas e fungos que podem ser transmitidas direta ou indiretamente de uma pessoa para outra [1]. Como consequência do uso indiscriminado de antibióticos pela população mundial, inúmeras cepas de bactérias e fungos desenvolveram mecanismos de resistência a ação de agentes antimicrobianos tradicionalmente utilizados [2 – 4].

É nesse cenário, que o uso de produtos naturais, incluindo as plantas medicinais, tornou-se cada vez mais importante nos cuidados primários da saúde por todo mundo [5]. Historicamente, as plantas tem se revelado uma excelente fonte de agentes biologicamente ativos, sendo consideradas um importante reservatório de novas substâncias antimicrobianas a serem usadas no desenvolvimento de medicamentos de interesse médico e odontológico [6,5,2,7,8,3,9].

As condições ambientais que envolvem a cavidade oral favorecem o desenvolvimento de infecções e inflamações causadas por microrganismos como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Candida spp.* Como exemplo, tem-se o *Streptococcus mutans*, importante agente etiológico da cárie dental que liga-se a superfície do dente para formar o biofilme [10], e a *Candida albicans* comumente identificada em próteses dentárias e na candidíase oral [11].

A *Guapira Graciliflora* Mart. pertence à família Nyctaginacea, presente na Caatinga, principal bioma do semiárido brasileiro [12], sendo referenciada como medicinal pela população nativa dessa área [13,14]. Estudos revelaram que a *Guapira Graciliflora* Mart. apresentou atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* [15,16], no entanto os testes realizados em *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* e *Candida krusei* não demonstraram ação antifúngica [12].

O estabelecimento de terapias alternativas com novos antimicrobianos adequados ao uso em seres humanos são de extrema relevância em função do surgimento de vários microrganismos resistentes. Diante dessa assertiva, o presente estudo avaliou o potencial antimicrobiano da *Guapira Graciliflora* Mart. contra microrganismos relacionados a patologias infecciosas orais: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans*, através do método da microdiluição em caldo.

## Métodos

### Material Vegetal e Extração

As folhas da *Guapira Graciliflora* Mart. foram coletadas na região do semiárido do Nordeste Brasileiro no período de julho/agosto de 2012. O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa (FANEM<sup>®</sup>, 330) a 40°C. O espécime testemunho encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACM),

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil (n° 907/ ACAM). A extração foi realizada com etanol a 50% pelo processo de maceração durante cinco dias. O extrato foi concentrado a vácuo utilizando evaporador rotativo (Quimis®, Q344M) a 40°C, em seguida liofilizado e armazenado sob refrigeração a -4°C para posterior uso, obtendo-se o extrato hidroalcoólico liofilizado da *Guapira Graciliflora* Mart. (EOHLG).

## **Ensaio Antimicrobianos**

### **Condições de Crescimento Microbiano**

Foram utilizadas seis cepas de referência de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (7073), *Streptococcus oralis* (ATCC 1055), *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) e *Candida albicans* (ATCC 18804), além de cepas clínicas de *Candida Albicans* (11, 410) obtidas da coleção do Laboratório de Pesquisas Antimicrobianas da Universidade Estadual da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meio de cultura Brain Heart Infusion Ágar (BHI) para bactérias e o Ágar Sabouraud Dextrose para leveduras.

### **Preparação do Inóculo**

As suspensões microbianas foram preparadas em meio estéril, conforme o microrganismo, resultando em um padrão de  $5 \times 10^5$  UFC/ml para bactérias e  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml para leveduras por poço da microplaca inoculado [17,18].

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Utilizou-se o método da microdiluição em caldo (MDC) para determinação da CIM. Em placa de 96 poços, depositou-se 100 µl/poço de meio, acrescentou-se 100 µl do EOHG no primeiro poço das devidas colunas procedendo-se a 8 micro diluições. Em seguida, 100 µl/poço do inóculo foram adicionados e as placas incubadas por 24h/37°C em atmosfera aeróbia ou microaerofilia de acordo com o microrganismo [17,18]. Como controles positivos utilizou-se clorexidina (Sigma-Aldrich®) e nistatina (Sigma-Aldrich®), e como controle negativo foram adicionadas as placas de forma individualizada meio de cultura e extrato.

Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL da solução de resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich®) e a CIM definida como a menor concentração do EOHG capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória. Com relação as leveduras, observou-se, através da inspeção



visual, a formação ou não de colônias. Nos testes de atividade antimicrobiana, utilizou-se meio BHI caldo para bactérias e meio Sabouraud Dextrose caldo para leveduras.

### ***Determinação da Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM)***

A CBM/CFM foi determinada pelo plaqueamento de 50  $\mu$ L da CIM e de uma concentração acima desta, subcultivadas em meio BHI Ágar e Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C/ 24 h. As CBM/CFM foram definidas como a menor concentração que inibiu crescimento visível no meio utilizado.

### **Análise Fito química**

#### ***Compostos fenólicos totais***

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência [19]. A leitura foi realizada a 765 nm em espectrofotômetro (Femto 600S).

#### ***Dosagem de proteína***

A concentração de proteína foi determinada usando-se o reagente Bradford [20]. A Albumina Sérica Bovina foi utilizada como padrão. A leitura foi realizada a 595 nm em leitor de microplacas (Epoch, Biotek®, Gen5 Data Analysis Software).

#### ***Açúcares Totais***

A quantificação de açúcares foi determinada pelo método de Dubois através da formação de compostos fufural a partir da desidratação dos açúcares por ácido sulfúrico (P.A.) [21]. A leitura foi realizada a 490 nm em espectrofotômetro (Femto 600S).

## **Resultados**

O extrato apresentou atividade sobre todos os microrganismos testados, sendo os melhores resultados observados frente ao *S. mutans* (12,50  $\mu$ l/  $\mu$ l), *S. mitis* (12,50  $\mu$ l/  $\mu$ l) e *S. salivarius* (6,25  $\mu$ l/  $\mu$ l) (Tabela 1).

Para segunda etapa, com o extrato liofilizado, foi procedida a diluição de 8mg do EOHLG em 1ml de água destilada estéril, obtendo-se uma solução de EOHLG a 8mg/ml. O EOHLG a 8mg/ml apresentou atividade antimicrobiana sobre as cepas clínicas de *Candida albicans* (11) e (410), CIM de 0,5mg/ml e 2mg/ml, respectivamente. Os demais

microrganismos testados foram resistentes ao EOHLG (Tabela 2). A análise fito-química revelou que extrato possui 3% de proteínas, 13% de açúcares totais e 17% de compostos fenólicos (Figura 1).

## Discussão

As CIM's obtidas através da MDC são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e, portanto, servem de parâmetro ao julgamento de todos os outros métodos de susceptibilidade [22].

Nos testes preliminares, o extrato mostrou atividade contra todos os microrganismos avaliados, excepcionalmente sobre o *S. mutans* (12,50 µl/ µl), *S. mitis* (12,50 µl/ µl) e *S. salivarius* (6,25 µl/ µl). Igualmente ao observado, foi relatado que os extratos hidroalcoólicos das folhas e cascas da *Guapira Graciliflora* Mart. apresentaram atividade antimicrobiana sobre bactérias relacionadas à infecção endodôntica *S. aureus* (12,50 e 12,50 µl/ µl), *E. faecalis* (12,50 e 6,25 µl/ µl) e *E. coli* (12,50 e 6,25 µl/ µl) [15]. De acordo com Costa et al [16], o extrato etanólico do caule da *Guapira Graciliflora* Mart. demonstrou ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (CIM ≥ 1024 µg/ml) e *K. pneumoniae* (CIM = 512 µg/ml).

Oliveira et al [5] observaram que os extratos de *Equisetum arvense* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Punica granatum* L., *Stryphnodendron barbatimam* Mart. apresentaram ação antimicrobiana frente ao *S. mutans* nas concentrações de 25mg/ml, 100 mg/ml, 12,5 mg/ml e 3,13 mg/ml, respectivamente; enquanto a *C. albicans* foi susceptível aos extratos na concentração de 50 mg/ml. De forma semelhante, os extratos de *Garcinia lucida* (CIM = 250 µg/ml), *Fagara heitzii* (CIM = 500 µg/ml) e *Hymenocardia lyrata* (CIM = 500 µg/ml) exerceram ação antifúngica sobre a *C. albicans* [6].

Diferentemente dos resultados preliminares, o EHOLG não apresentou qualquer atividade antimicrobiana frente as cepas de referência, porém sua ação antifúngica foi ratificada sobre as cepas clínicas de *C. albicans* (LM 11) e *C. albicans* (LM 410) com CIMs de 0,5mg/ml e 2 mg/ml, respectivamente. No estudo de Chaves et al [12], o extrato da *Guapira Graciliflora* Mart. mostrou-se ineficaz contra *S. oralis* (ATCC), *S. salivarius* (ATCC) e *C. albicans* (ATCC), o que pode ser justificado por diferenças na parte da planta utilizada (casca), na forma de extração e época de coleta do material vegetal. Sabe-se que fatores inerentes a estação do ano, forma de extração e parte da planta utilizada influenciam nos compostos obtidos e nas atividades bioativas apresentadas pelos extratos [24, 25].

O estudo de Ishida et al [23] demonstrou que as frações aquosa e acetato de etila do extrato de *Stryphnodendron spp.* apresentaram atividade antifúngica significativa contra cepas clínicas de *C. albicans*, revelando que a presença de taninos na planta afetou a integridade da parede celular do fungo, fator que contribuiu para a diminuição da adesão às células hospedeiras e formação do tubo germinativo, além de afetar o processo de brotamento e estimular a fagocitose.

Como é sabido, a atividade antimicrobiana de extratos ocorre pela ação combinada de compostos químicos presentes nas plantas, e não pela atividade isolada desses compostos [24]. Sendo assim, a diferença de resultados encontrada neste trabalho entre o EHOE e o EHOE pode ser reflexo da perda ou inativação de algum composto relacionado a ação antimicrobiana durante o processo de liofilização.

Com atividade antimicrobiana comprovada em estudos anteriores [15,16], os resultados negativos apresentados por esse trabalho, podem ser explicados pela ausência ou insuficiência de algum metabólito secundário, na amostra utilizada, responsável pela ação antimicrobiana da planta, o que pode estar relacionado ao solvente utilizado na preparação do extrato ou a época da coleta [25]. Estudos fito químico mais detalhados da *Guapira Graciliflora* Mart. devem ser realizados a fim de identificar os metabólitos ativos responsáveis por seu potencial antimicrobiano.

## Conclusão

Com base nos achados gerais do presente trabalho pode-se inferir que a *Guapira Graciliflora* Mart. apresenta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans* testados. A atividade antimicrobiana exercida pelo extrato sofreu influência do processo de liofilização, indicando que algum composto foi perdido durante essa etapa. As linhagens de *C. albicans* apresentaram maior sensibilidade ao extrato da *Guapira Graciliflora* Mart.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Lista de Abreviaturas

EOHG: Extrato hidroalcolico da *Guapira Graciliflora* Mart.;

EOHLG: extrato hidroalcolico liofilizado da *Guapira Graciliflora* Mart.;

BHI: Brain Heart Infusion;

CIM: Concentração Inibitória Mínima;

MDC: Microdiluição em Caldo;

CBM: Concentração Bactericida Mínima;

CFM: Concentração Fungicida Mínima.

## Contribuição dos Autores

TKA desenvolveu os experimentos e escreveu o manuscrito; GPG contribuiu com o processo de escrita do manuscrito e supervisionou o trabalho. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## Detalhes dos Autores

<sup>2</sup> Mestranda em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, Campina Grande, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Doutor de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, Campina Grande, Brasil.

## Referências

1. World Health Organization: **Infectious diseases**  
[[http://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/)]
2. Talib WH, Zarga MHA, Mahasneh AM: **Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa***. *Molecules* 2012, **17**: 3291-3303.

3. Assob JCN, Kamga HLF, Nsagha DS, Njunda AL, Nde PF, Asongalem EA, Njouendou AJ, Sandjon B, Penlap VB: **Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine.** *BMC Complement. Altern. Med* 2011, **11**:70.
4. Bibi Y, Nisa S, Chaudhary FM, Zia M: **Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan.** *BMC Complement Altern Med* 2011, **11**: 52-58.
5. Oliveira JR, VC de Castro, Vilela PGF, Camargo SEA, Carvalho CAT, Jorge AOC, Oliveira LD: **Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry.** *BMC Complement. Altern. Med* 2013, **13**:208.
6. Dzoyem JP, Guru SK, Pieme CA, Kuete V, Sharma A, Inshad Ali Khan IA, Saxena AK, Vishwakarma RA: **Cytotoxic and antimicrobial activity of selected Cameroonian edible plants.** *BMC Complement. Altern. Med* 2013, **13**:78.
7. Nielsen RH, Kuete V, Jäger AK, Meyer JJM, Lall N: **Antimicrobial activity of selected South African medicinal plants.** *BMC Complement. Altern. Med* 2012, **12**:74.
8. Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR. **Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of brazil.** *Braz J Microbiol* 2012, **43**(4): 1302-1308.
9. Mothana RA, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski PJ: **Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidante potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqotra.** *BMC Complement. Altern. Med* 2009, **9**:7.
10. Cheon K, Moser SA, Wiener HW, Whiddon J, Momeni SS, Ruby JD, Cutter GR, Childers NK: **Characteristics of Streptococcus mutans genotypes and dental caries in children.** *Eur J Oral Sci* 2013, **121**(31): 148–155.
11. Shin SH, Lee YS, Shin YP, Kim B, Kim MH, Chang HR, Jang WS, Lee IH: **Therapeutic efficacy of halocidin-derived peptide HG1 in a mouse model of Candida albicans oral infection.** *J Antimicrob Chemother* 2013, **68** (5): 1152-1160.
12. Chaves TP, Santana CP, Vêras G, Brandão DO, Felismino DC, Medeiros ACD, Trovão DMBM: **Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine.** *Afr J Biotechnol* 2013, **12**(8):847-853.
13. Siqueira CQF, Cabral DLV, Peixoto Sobrinho TJS, Amorim ELC, Melo JG, Araújo TAS, Albuquerque UP: **Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies.** *Evid-Based Compl Alt* 2012, **2012**:7.

14. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM: **Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil.** *Braz J Pharmacogn* 2008, **18**:472-508.
15. Rocha EALSS, Carvalho AVOR, Andrade SRA, Ana Cláudia Dantas de Medeiros ACD, Trovão DMBM, Costa EMMB: **Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica.** *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2013, **34**(3):351-355.
16. Costa JGM, Campos AR, Brito SA, Pereira CKB, Souza EO, Rodrigues FFG: **Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria.** *Pharmacogn Mag* 2010, **6**(24): 331–334.
17. CLSI: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard** In *CLSI document M07-A8. Volume 29.* 8nd edition. Edited by Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009: 9-49.
18. CLSI: **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts** In *CLSI document M27-A3. 3rd Informational Supplement.* Edited by Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
19. Folin O, Ciocalteu V: **On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.** *J Biol Chem* 1927, **73**: 627–650.
20. Bradford M. M: *Anal. Biochem* 1976, **72**: 248.
21. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F: **Colorimetric method for determination of sugar, and related substances.** *Anal Chem* 1956, **28**(3): 350-356.
22. Andrews JM: **Determination of minimum inhibitory concentrations.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **48**(1):5-16.
23. Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias FBP, Nakamura TU, Nakamura CV: **Influence of tannins from *stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **58**:942–949.
24. Silva SRS, Demuner AJ, Barbosa LCA, Andrade NJ, Nascimento EA, Pinheiro AL: **Analysis of chemical constituents and antimicrobial activity of essential oil of *Mameluca alternifolia* Cheel.** *Braz J Med Plants* 2003, **6**:63-70.
25. Ncube B, Finnie JF, Van Staden J: **Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa.** *South Afr J Bot* 2010, **79**:1-10.

## Figuras

### Figura 1 - Concentração de compostos fenólicos totais, proteína e açúcares totais do EHOLG.

Resultados da análise fito química para quantificação de compostos fenólicos totais com o reagente de Folin Ciocalteu, dosagem de proteínas por Bradford e dosagem de açúcares totais pelo teste colorimétrico de Dubois.

## Tabelas

### Tabela 1 - Valores da CIM ( $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ ) para o extrato de *Guapira Graciliflora* Mart. sobre os microrganismos avaliados.

Esta tabela traz os valores da CIM e CBM/CFM para cada cepa de microrganismo testado. O valores aqui expressos dizem respeito ao EOHG antes do processo de liofilização.

### Tabela 2 - Valores da CIM (mg/ml) para o EOHG sobre os microrganismos avaliados.

Esta tabela traz os valores da CIM e CBM/CFM para cada cepa de microrganismo testado, além das cepas de referência, temos as cepas clínicas. Os valores aqui expressos dizem respeito ao EOHLG.

**Tabela 1**

Microrganismos*	Extrato ( $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ )			Clorexidina <sup>c</sup>		Nistatina <sup>c</sup>	
	CIM	CBM	CFM	CIM	CBM	CIM	CFM
<i>S. mutans</i>	12.50	12.50	-	H	H	-	-
<i>S. salivarius</i>	6.25	R	-	H	H	-	-
<i>S. oralis</i>	12.50	25.00	-	H	H	-	-
<i>S. parasanguinis</i>	25.00	25.00	-	H	H	-	-
<i>S. mitis</i>	12.50	25.00	-	H	H	-	-
<i>C. albicans</i>	25.00	-	25.00	-	-	H	H

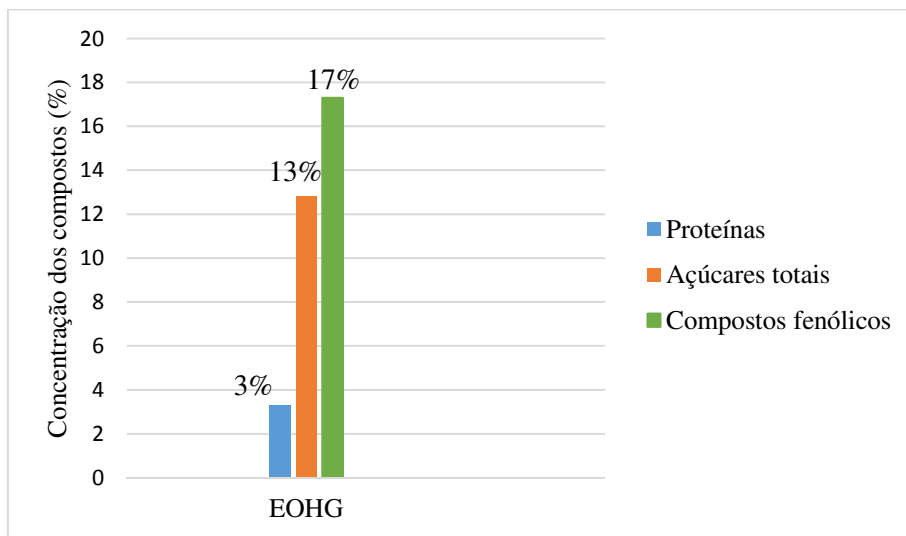
\*: Cepas de referência; -: não se aplica; <sup>c</sup>: controles positivos; R: resistente; H: concentração do último poço.

Tabela 2

Microrganismos	Extrato (mg/ml)			Clorexidina <sup>c</sup>		Nistatina <sup>c</sup>	
	CIM	CBM	CFM	CIM	CBM	CIM	CFM
<i>S. mutans</i>	R	R	-	H	H	-	-
<i>S. salivarius</i>	R	R	-	H	H	-	-
<i>S. oralis</i>	R	R	-	H	H	-	-
<i>S. parasanguinis</i>	R	R	-	H	H	-	-
<i>S. mitis</i>	R	R	-	H	H	-	-
<i>C. albicans</i>	R	-	R	-	-	H	H
<i>C. albicans</i> (LM 11) *	0.5	-	1	-	-	H	H
<i>C. albicans</i> (LM 410) *	2	-	2	-	-	H	H

\*: Cepas clínicas; -: não se aplica; <sup>c</sup>: controles positivos; R: resistente; H: concentração do último poço.

Figura 1





## 4.3 ARTIGO 2 A SER SUBMETIDO

*Molecules* **2014**, *19*, 1- 13 manuscrito; doi:10.3390/molecules190x0000x

OPEN ACCESS

*molecules*

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Artigo

## Efeito Antiproliferativo e Indução de Apoptose em Células de Câncer Oral pelo Extrato da *Guapira graciliflora* Mart.

Thiara Araújo<sup>1</sup>, Gustavo Godoy<sup>2,\*</sup>

<sup>1,2</sup> Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Brasil

Todos os autores contribuíram igualmente para o desenvolvimento deste trabalho.

\* Autor a quem correspondência deve ser endereçada; E-Mail: gruiga@hotmail.com;

Fax: +55 83 3315-3471.

---

**Resumo:** Produtos naturais, incluindo plantas, têm sido considerados como valiosas fontes para a descoberta de novas drogas anticâncer. Em função da enorme diversidade, a flora brasileira desempenha papel importante na descoberta de potenciais drogas antitumorais. O presente estudo investigou o potencial antiproliferativo do Extrato Hidroalcoólico da *Guapira Graciliflora* Mart. (EOHG) frente a células de carcinoma de células escamosas oral de língua (CCEOL), cuja atividade inibitória foi avaliada nas linhagens celulares SCC 9 e HSC 3 pelo ensaio MTT, enquanto a indução de apoptose foi observada pelo teste da coloração anexina V/PI. O EOHG a 200 µg/ml reduziu a proliferação das células SCC 9 e HSC 3, apresentando respectivamente taxas de inibição de 49% e 63% no intervalo de 48h. A taxa de apoptose celular em HSC 3 foi 19,29%. O EOHG apresentou efeito inibitório frente as linhagens de CCEOL SCC 9 e HSC 3. O teste da anexina V/PI revelou indução de apoptose celular, sugerindo que houve danos a membrana celular e nuclear. Dessa forma, conclui-se que a *Guapira Graciliflora* Mart. constitui uma promissora fonte de quimioterápicos a serem usados no tratamento do CCEO.

**Descritores:** Anticâncer; Apoptose; SCC 9; SCC 25; HSC 3; *Guapira Graciliflora* Mart.

---

## 1 Introdução

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta forma mais comum em todo o mundo, e 90% dessas lesões corresponde ao carcinoma de células escamosas (CCE) que acomete a mucosa da cavidade oral, vermelhão do lábio, orofaringe, laringe e hipofaringe [1,2]. O CCE é a oitava causa mais comum de morte por câncer em todo o mundo, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade, com sobrevida de cinco anos registrada em apenas 50% dos casos [1,3].

Numerosos fatores estão implicados no desenvolvimento do CCE oral (CCEO), destacando-se entre eles o consumo crônico do tabaco e do álcool, sendo a exposição crônica a radiação ultravioleta do sol o fator de risco para o desenvolvimento do CCE de lábio [4,5,2]. Durante as últimas décadas, condutas agressivas de tratamento têm sido utilizadas de forma combinada na terapia do CCEO, incluindo radioterapia, cirurgias radicais e quimioterapia [1,3,6].

Apesar dos avanços consideráveis na terapêutica e nos meios de diagnóstico, o prognóstico do CCEO continua sombrio, principalmente por ser uma lesão não responsiva ao tratamento quimioterápico [3]; sendo assim, o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos sinaliza uma opção promissora na busca de melhores resultados no tratamento do CCEO.

Os constituintes bioativos das plantas medicinais ocupam lugar de destaque na pesquisa anticâncer no mundo, graças à sua capacidade em suprimir diferentes fases da transformação maligna. O potencial antitumoral de extratos e compostos vegetais pode ser atribuído à sua capacidade em induzir mudanças na regulação dos alvos moleculares nas vias de transdução do sinal oncogênico, implicados no crescimento e replicação das células, na apoptose, na angiogênese, na invasão e metástase das células tumorais [7-9].

A *Guapira Graciliflora* Mart. pertence à família Nyctaginacea, presente na Caatinga, principal bioma do semiárido brasileiro [10], sendo referenciada como medicinal pela população nativa dessa área [11,12]. Estudos revelaram que a *Guapira Graciliflora* Mart. apresenta comprovada atividade antimicrobiana [13,14].

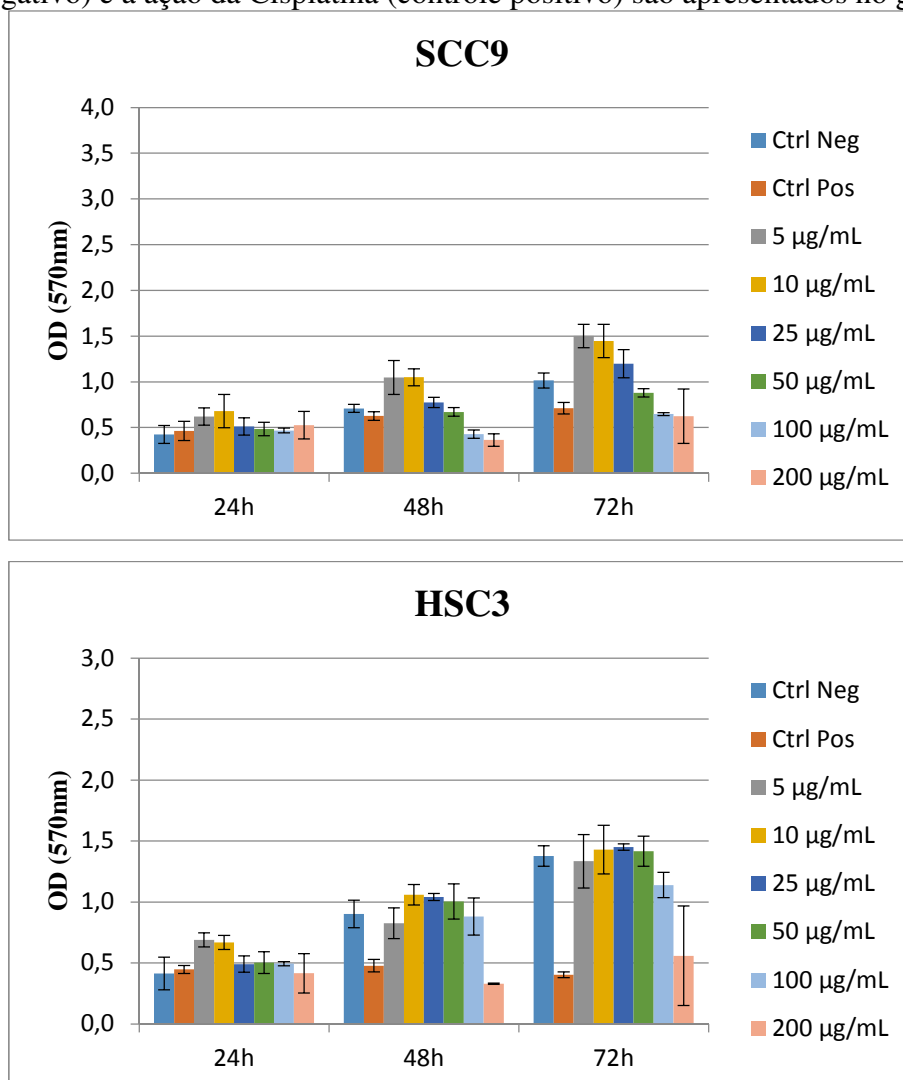
O propósito do presente estudo consistiu em avaliar o potencial antiproliferativo do EOHG frente a três linhagens de CCEOL humano: SCC 9 e HSC 3. Testes fito-químicos foram realizados com o intuito de quantificar a concentração de compostos fenólicos presentes no extrato testado.

## 2 Resultados

Para determinação do efeito antiproliferativo da *Guapira Graciliflora* Mart., as linhagens celulares SCC 9 e HSC 3 foram tratadas com várias concentrações do EOHG e avaliadas em intervalos de 24, 48 e 72 horas. O sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazólio) é reduzido metabolicamente, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular, assim através do teste MTT pode-se avaliar a viabilidade e a proliferação.

Houve redução da proliferação de células SCC 9 e HSC 3 de forma dependente do tempo e da concentração. Os efeitos mais marcantes foram observados nas concentrações 100µg/ml e 200 µg/ml (Figura 1). A função mitocondrial nas células SCC 9 e HSC 3 foi mais eficientemente reduzida pelo EOHG a 200 µg/ml em 48 horas.

Figura 1. Efeito do extrato sobre as linhagens de CCEO correlacionando concentração com valores de absorbância. Os valores inerentes ao crescimento normal celular (controle negativo) e a ação da Cisplatina (controle positivo) são apresentados no gráfico.



As melhores taxas de inibição do crescimento celular das linhagens SCC 9 e HSC 3, 49% e 63% respectivamente, foram desempenhadas pelo EOHG a 200 µg/ml em 48h, nessas condições o extrato mostrou-se mais eficiente que o controle positivo (Tabela 1), e a linhagem HSC 3 mostrou-se mais sensível ao efeito antiproliferativo do EOHG.

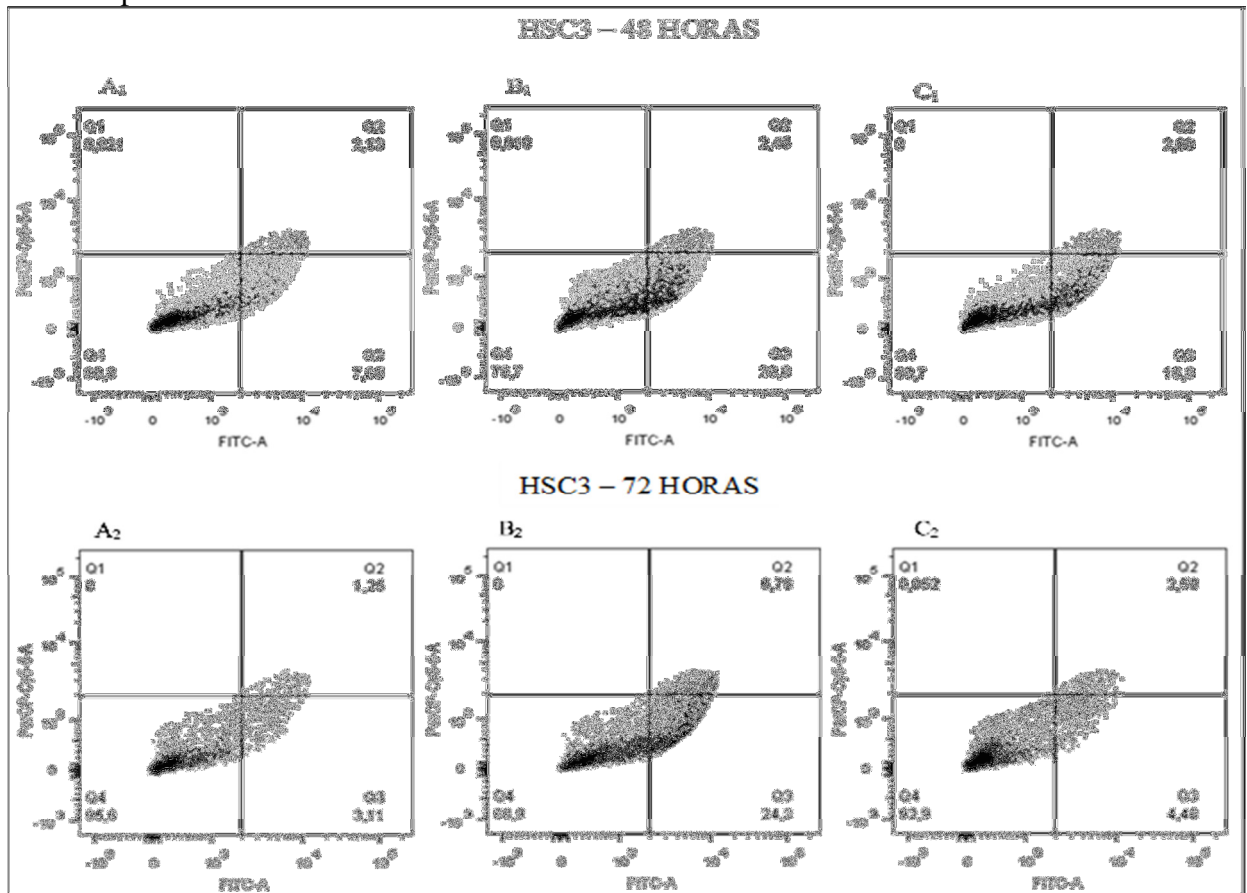
Tabela 1. Taxas de inibição de crescimento sobre as linhagens de CCE desempenhadas pelo extrato, em diferentes concentrações, e pela Cisplatina em intervalos de tempo de 48 e 72 horas em comparação com o controle negativo.

Composto	Taxa de Inibição de Crescimento (%)			
	SCC9		HSC3	
	48 h	72 h	48 h	72 h
EOHG 5 µg/ml	- 48	- 48	8	3
EOHG 10 µg/ml	- 48	- 43	- 17	- 4
EOHG 25 µg/ml	- 9	- 18	- 15	- 5
EOHG 50 µg/ml	5	13	- 11	- 3
EOHG 100 µg/ml	40	36	2	17
EOHG 200 µg/ml	40	38	63	59
Cisplatina	12	30	47	71

A externalização da fosfatidilserina (PS) precede a perda da integridade da membrana acompanhada de eventos posteriores que induzem a morte celular por apoptose ou necrose. O marcador anexina V-FITC detecta os estágios iniciais de apoptose devido ao fato de se ligar preferencialmente a fosfolipídios negativamente carregados (fosfatidilserina) expostos no início do processo apoptótico, enquanto o iodeto de propídeo (PI) permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular, por ser um marcador que interage com o DNA.

O método de dupla coloração anexina V/PI foi adotado para avaliar morte celular e as células HSC 3 foram utilizadas no teste por ter apresentado maior sensibilidade ao EOHG. Três populações celulares são apresentadas na citometria de fluxo: células viáveis (anexina V -/ PI -), células em apoptose precoce (anexina V +/ PI -) e células em apoptose tardia (anexina V+/PI +). O EOHG a 200 µg/ml induziu apoptose celular nas células HSC 3 em 48h e 72h, as respectivas taxas de apoptose [Q2 + Q3] foram 19,29% e 7,07% (Figura 2). A análise fitoquímica revelou que extrato possui 3% de proteínas, 13% de açúcares totais e 17% de compostos fenólicos.

Figura 2. Taxas de apoptose em células HSC3 tratadas com EOHG a 200  $\mu\text{g/ml}$  durante 48 e 72h (C1 e C2). Os gráficos A1 e A2 tratam do controle negativo, B1 e B2 se referem ao controle positivo.



### 3 Discussão

Estudos recentes revelam a preocupação com o aumento da prevalência de câncer no mundo em um futuro próximo [15]. Os carcinomas de cavidade oral, principalmente o carcinoma de células escamosas, tornaram-se um importante problema de saúde em todo o mundo. A taxa de sobrevivência dos carcinomas orais é menor do que a maioria dos outros carcinomas, não sendo observada qualquer melhora substancial desses índices nos últimos anos [6]. Pesquisadores, impulsionados por essa sombria perspectiva, intensificam a busca por drogas naturais de baixo custo que possam ser usadas no tratamento do câncer oral.

A Caatinga do Nordeste brasileiro oferece uma grande variedade de recursos vitais para a sobrevivência da população local [10]. A importância em avaliar o potencial farmacológico e químico dos vegetais presentes na Caatinga do Nordeste brasileiro, não reside apenas na busca por novas substâncias oriundas das plantas, mas também na apreciação ecológica da região, uma vez que o conhecimento dessas espécies permitirá a proposição de planos para conservação desse bioma, estimulando o uso sustentável das plantas exploradas.

A *Guapira Graciliflora* Mart., presente na Caatinga do Nordeste brasileiro [10], é utilizada na medicina popular para tratamento de tuberculose, como anti-inflamatório e cicatrizante [11, 12]. Apesar do seu uso pela população da região do semiárido brasileiro, estudos avaliando as propriedades fitoquímicas e farmacológicas da *Guapira Graciliflora* Mart não têm sido relatados.

O teste MTT utilizado para avaliar a capacidade inibitória do EOHG, revelou que o extrato foi capaz de exercer atividade antiproliferativa sobre a linhagem SCC 9 nas concentrações de 50 µg/ml, 100 µg/ml e 200 µg/ml em 48 e 72h. Nos mesmos intervalos de tempo a linhagem HSC 3 mostrou-se sensível ao extrato a 100 µg/ml e 200 µg/ml, adicionalmente a atividade mitocondrial mostrou-se mais deficiente frente ao EOHG a 200 µg/ml em 48h para as duas linhagens.

Comparado ao controle positivo, o EOHG mostrou melhor desempenho frente a linhagens estudadas em 48h, revelando taxas de inibição superiores a Cisplatina. O teste da anexina V/PI apresentou células HSC 3 tratadas com o EOHG 200 µg/ml em apoptose precoce e tardia, demonstrando que o EOHG foi capaz de causar danos a estrutura das membranas celular e nuclear.

Estudos revelam que produtos de origem natural induzem apoptose em células tumorais por meio de vários mecanismos como: ativação da cascata de caspases, disfunção mitocondrial, aumento da expressão de moléculas apoptóticas, estresse do retículo endoplasmático com acúmulo de proteínas mal dobradas e ativação da p53 [16 – 19].

De forma semelhante ao presente trabalho, a avaliação da atividade antiproliferativa de extratos brutos frente a linhagens de células tumorais foi foco de outras pesquisas. O extrato etanólico a 80% de açafraão foi avaliado nas linhagens HCT (câncer de cólon) selvagem e HCT p53-/- reduzindo a proliferação celular em doses entre 1mg/ml a 4mg/ml [20]. A linhagem MCF-7 de câncer de mama teve sua proliferação reduzida em 50% quando tratada com o extrato aquoso de *Urtica dioica* a 2mg/ml [21]. O extrato clofórmico da *B. pinnata* a 552 µg/ml apresentou taxa de inibição de 50% sobre a linhagem celular Hela [22]. Igualmente aos achados dessa pesquisa, apoptose foi a forma de morte celular observada nos estudos anteriormente citados, porém os autores empregaram doses altas de seus extratos para obtenção de resultados semelhante àqueles alcançados neste trabalho, mostrando assim, um melhor desempenho do EOHG.

A busca por drogas mais eficientes no tratamento de carcinomas vem sendo explorada em diversos estudos. O isoalantolactone, composto isolado das raízes da *Inula helenium* L, exerceu atividade antiproliferativa na linhagem celular UM-SCC-10 (carcinoma de faringe),

induzindo apoptose das células [1, 3]. A viabilidade de células de CCEO, CA9-22, foi significativamente reduzida quando tratadas com o extrato metanólico da *Gracilaria tenuistipitata* [3]. O Salvianolic ácido B, isolado da *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), inibiu o crescimento em 50% das linhagens de CCEO CAL27 e SCC 4, de forma dependente do tempo, nas concentrações de 51µg/ml e 87 µg/ml respectivamente [6]. No entanto, pela primeira vez um estudo trata do efeito antiproliferativo e apoptótico da *Guapira Graciliflora* Mart. sobre linhagens celulares de CCEO.

Nos últimos anos, a descoberta de drogas anticâncer focou-se em uma ampla variedade de compostos naturais, especialmente os compostos fenólicos. Há relatos de compostos fito químicos que interferem nas diferentes vias de sinalização intracelular envolvidas na iniciação, promoção e progressão do câncer. Os efeitos antitumorais de constituintes das plantas estão sendo associados com a indução de enzimas de desintoxicação, eliminação de radicais livres, atividade anti-inflamatória, parada do ciclo celular, desencadeamento de apoptose, inibição da angiogênese tumoral e da invasão [7 – 9].

O potencial antiproliferativo e a capacidade em induzir apoptoses nas células tumorais pelo EOHG pode estar ligada a presença de compostos fenólicos em sua composição, tendo em vista que compostos fenólicos são bons antioxidantes [23]. Estudos futuros devem focar-se no isolamento e na avaliação do potencial antiproliferativo desses compostos fenólicos presentes no EOHG.

Drogas antitumorais que induzem apoptose e assim suprimem o crescimento adicional do tumor podem desempenhar papel importante no tratamento clínico das neoplasias malignas. O EOHG exerceu efeito antiproliferativo e apoptótico, mesmo empregado em baixas concentrações, sobre as linhagens de CCEO estudadas, revelando-se uma fonte promissora para obtenção de drogas a serem utilizadas no tratamento das neoplasias malignas da cavidade oral.

## **4 Seção Experimental**

### *4.1 Material Vegetal e Método de Extração*

As folhas da *Guapira Graciliflora* Mart. foram coletadas na região do semiárido do Nordeste Brasileiro no período de julho/agosto de 2012. O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa (FANEM<sup>®</sup>, 330) a 40°C. O espécime testemunho encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACM), Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil (n°

907/ ACAM). A extração foi realizada com EtOH a 50% pelo processo de maceração durante cinco dias. O extrato foi concentrado a vácuo utilizando evaporador rotativo (Quimis<sup>®</sup>, Q344M) a 40°C, em seguida liofilizado e armazenado sob refrigeração a -4°C para posterior uso. Obtendo-se o extrato hidroalcolólico bruto da *Guapira Graciliflora* Mart. (EOHG).

#### 4.2 Preparação das Amostras

Para realização dos testes, o extrato liofilizado foi diluído em meio (DMEM/F-12; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) estabelecendo-se uma solução na concentração de 200µg/ml, a partir desta, as demais concentrações (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml e 5 µg/ml) foram estabelecidas.

#### 4.3 Cultura Celular

Três linhagens celulares derivadas de CCEOL humano SCC 9 e SCC 25 da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), e HSC 3 (JCRB0623) da Health Science Research Resources Bank (Japan Health Sciences Foundation), foram mantidas com meio Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM/F-12; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil), 400ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) e 1% de solução antibiótico-antimicótico (GIBCO, USA) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4 Ensaio de Atividade Antiproliferativa

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT descrito pela primeira vez por Mosmann [24]. Foi adicionado 100µl de células em suspensão nas placas de 96 poços (5x10<sup>3</sup> células por poço), as placas foram incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) por um período de 24 h. Diferentes concentrações do EOHG (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml e 5 µg/ml) foram adicionadas aos poços (100 µl/poço), a Cisplatina (5 µM; 1mg/ml; Blau<sup>®</sup>) foi usada como controle positivo. As placas foram incubadas (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e o teste se procedeu nos intervalos de 24, 48 e 72h. Adicionou-se 100µl/poço da solução de MTT (1mg/ml de meio) seguida de 4h de incubação. O meio foi aspirado e 100µl/poço de álcool P.A foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. A leitura se procedeu em leitor de microplacas com comprimento de onda 570nm (Epoch, Biotek<sup>®</sup>, Gen5 Data Analysis Software), onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular.



#### 4.5 Coloração por Anexina V e Iodeto de Propídeo

Para detecção das apoptoses, utilizou-se o kit FITC/Annexin V Dead Cell Apoptosis Kit with FITC Annexin and PI, for Flow Cytometry (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA). Células SCC 9 e HSC 3 ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas em triplicata, em placas de 6 poços por um período de 24h. Adicionou-se 2ml do EOHG a 200 $\mu$ g/ml e 2ml do controle positivo (Cisplatina; 5 $\mu$ M) nos referidos poços. Após cada intervalo de tempo (24, 48 e 72 h), as células foram tripsinizadas, coletadas e lavadas com tampão PBS gelado. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 200  $\mu$ l de Binding Buffer. Adicionou-se 3  $\mu$ l de Annexin V – FITC e 1  $\mu$ l da solução de PI a 100  $\mu$ g/mL. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e mantidas sob proteção da luz. Em seguida, foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão de ligação para anexina V. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences), medindo a emissão de fluorescência a 530 nm e 575 nm, e os dados analisados a partir do software FlowJo v. 7.6.3 (Tree Star, Inc.).

#### 4.6 Análise Fito química

##### 4.6.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência [25]. A leitura foi realizada a 765 nm em espectrofotômetro (Femto 600S).

##### 4.6.2 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada usando-se o reagente Bradford [26]. A Albumina Sérica Bovina foi utilizada como padrão. A leitura foi realizada a 595 nm em leitor de microplacas (Epoch, Biotek<sup>®</sup>, Gen5 Data Analysis Software).

##### 4.6.3 Açúcares Totais

A quantificação de açúcares foi determinada pelo método de Dubois através da formação de compostos fufural a partir da desidratação dos açúcares por ácido sulfúrico (P.A.) [27]. A leitura foi realizada a 490 nm em espectrofotômetro (Femto 600S).

## 5 Conclusão

Com base no exposto, o EOHG apresentou efeito inibitório frente as linhagens de CCEO SCC 9 e HSC 3. A atividade antiproliferativa foi mais pronunciada na concentração de 200µg/ml em 48h em ambas as linhagens. O teste da anexina V/PI revelou indução de morte celular por apoptose, sugerindo a existência de dano a membrana celular e nuclear. A *Guapira Graciliflora* Mart. revelou-se promissora fonte de agentes anticâncer para o tratamento do carcinoma de células escamosas oral.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

## Referências

1. Wu, M.; Zhang, H.; Hu, J.; Weng, Z.; Li, C.; Li, H.; Zhao, Y.; Mei, X.; Ren, F.; Li, L. Isoalantolactone Inhibits UM-SCC-10A Cell Growth via Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction. *PLoS ONE* **2013**, 8, e76000. doi:10.1371/journal.pone.0076000
2. Batista, A.C.; Costa, N.L.; Oton-Leite, A.F.; Mendonça, E.F.; Alencar, R.C.; Silva, T.A. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radio. Endod.* **2010**, 109, 74-79.
3. Yen, C.C.; Yang, J.I.; Lee, J.C.; Tseng, C.N.; Chan, Y.C.; Hseu, Y.C.; Tang, J.Y.; Chuang, L.Y.; Huang, H.W.; Chang, F.R.; Chang, H.W. Anti-proliferative effect of methanolic extract of *Gracilaria tenuistipitata* on oral cancer cells involves apoptosis, DNA damage, and oxidative stress. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, doi:10.1186/1472-6882-12-14.
4. Udeabor, S.E.; Rana, M.; Gerd, G.W.; Gellrich, N.C.; Eckardt, A.M. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head & Neck Oncology* **2012**, 4, 1-7.
5. Ozi, J.M.; Suffredini, I.B.; Paciencia, M.; Frana, A.S.; Dib, L.L. In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz. Oral Res.* **2011**, 25, 519-25.

6. Yang, Y.; Ge, P.J.; Jiang, L.L.; Li, F.L.; Zhu, Q.Y. Modulation of growth and angiogenic potential of oral squamous carcinoma cells in vitro using salvianolic acid. *B. BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, doi:10.1186/1472-6882-11-54 11.
7. Mehta, R.G.; Murillo, G.; Naithani, R.; Peng, X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 950–961.
8. Neergheen, V.S.; Bahorun, T.; Taylor, E.W.; Jen, L.S.; Aruoma, O.I. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* **2010**, *278*, 229–241.
9. Amin, A.R.M.R.; Kucuk, O.; Khuri, F.R.; Shin, D.M. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2712–2725.
10. Chaves, T.P.; Santana, C.P.; Vêras, G.; Brandão, D.O.; Felismino, D.C.; Medeiros, A.C.D.; Trovão, D.M.B.M. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 847-853.
11. Siqueira, C.Q.F.; Cabral, D.L.V.; Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Amorim, E.L.C.; Melo, J.G.; Araújo, T.A.S.; Albuquerque, U.P. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. *Evid-Based Compl. Alt.* **2012**, doi:10.1155/2012/434782.
12. Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basílio, I.J.L.D.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharmacogn.* **2008**, *18*, 472-508.
13. Rocha, E.A.L.S.S.; Carvalho, A.V.O.R.; Andrade, S.R.A.; Medeiros, A.C.D.; Trovão, D.M.B.M.; Costa, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2013**, *34*, 351-355.
14. Costa, J.G.M.; Campos, A.R.; Brito, S.A.; Pereira, C.K.B.; Souza, E.O.; Rodrigues, F.F.G. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bactéria. *Pharmacogn. Mag.* **2010**, *6*, 331–334.
15. Bray, F.; Jemal, A.; Grey, N.; Ferlay, J.; David Forman, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet. Oncol.* **2012**, *13*,790-801.
16. Luo, J.; Hu, Y.; Kong, W.; Yang, M. Evaluation and Structure-Activity Relationship Analysis of a New Series of Arylnaphthalene lignans as Potential Anti-Tumor Agents. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93516, doi:10.1371/journal.pone.0093516.

17. Chen, B.; Jia, X.B. Apoptosis-Inducing Effect of Ginsenoside Rg6 on Human Lymphocytoma JK Cells. *Molecules* **2013**, *18*, 8109-8119, doi:10.3390/molecules18078109.
18. Yang, S.; Zhao, Q.; Xiang, H.; Minjie, L.; Zhang, Q.; Xue, W.; Song, B.; Yang, S. Antiproliferative activity and apoptosis inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer Cell International* **2013**, doi:10.1186/1475-2867-13-12.
19. Chan, Y.S.; Wong, J.H.; Fang, E.F.; Pan, W.; Ng, T.B. Isolation of a Glucosamine Binding Leguminous Lectin with Mitogenic Activity towards Splenocytes and Anti-Proliferative Activity towards Tumor Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e3896, doi:10.1371/journal.pone.0038961.
20. Bajbouj, K.; Schulze-Luehrmann, J.; Amin, D.S.; Schneider-Stock, R. The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, doi:10.1186/1472-6882-12-69.
21. Fattahi, S.; Ardekani, A.M.; Zabihi, E.; Abedian, Z.; Mostafazadeh, A.; Pourbagher, R.; Akhavan-Niaki, H. Antioxidant and Apoptotic Effects of an Extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 5317-5323.
22. Mahata, S.; Maru, S.; Shukla, S.; Pandey, A.; Mugesh, G.; Das, B.C.; Bharti, AC. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, doi: 10.1186/1472-6882-12-15.
23. Stewart, P.; Boonsiri, P.; Puthong, S.; Rojpibulstit, P. Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, doi:10.1186/1472-6882-13-60.
24. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
25. Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73*, 627-650.
26. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
27. Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.; Rebers, P.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar, and related substances. *Anal Chem. United State* **1956**, *28*, 350-356.

*Disponibilidade da Amostra:* Amostras de todos os compostos estão disponíveis com os autores do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.

© 2014 pelos autores; licenciado MDPI, Basel, Suíça. Este artigo é um artigo de livre acesso distribuído sob os termos e condições da licença Creative Commons Attribution (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento do câncer e das doenças infecciosas tem atraído o interesse de pesquisadores devido ao seu grande impacto na saúde da população. As taxas de mortalidade por câncer e a expectativa de novos casos apontadas por órgãos especializados, mostram que o dia a dia da batalha contra esta doença torna-se cada vez mais árduo. O uso indiscriminado de antibióticos, permitiu que bactérias e fungos desenvolvessem mecanismos de defesa aos antimicrobianos disponíveis para uso.

Dessa forma, a procura por novos agentes biologicamente ativos, oriundos de plantas medicinais, protagoniza o cenário das pesquisas científicas em todo o planeta. A partir desse prisma, o presente estudo investigou o potencial antimicrobiano da *Guapira Graciliflora* Mart. sobre microrganismos orais e seu potencial antiproliferativo, pela primeira vez, frente a linhagens celulares de CCEO.

O extrato da *Guapira Graciliflora* Mart. apresentou ação antimicrobiana frente as cepas de microrganismos orais utilizadas neste trabalho, com desempenho extraordinário sobre a *Candida Albicans*. A presente pesquisa mostrou que a *Guapira Graciliflora* Mart. pode atuar como agente antiproliferativo e indutor de apoptose, fornecendo uma importante base para desenvolvimento de quimioterápicos a serem usadas no tratamento do CCEO.

É interessante a realização de novos estudos envolvendo a *Guapira Graciliflora* Mart., a fim de esgotar todo o potencial farmacológico dessa planta como fonte natural de compostos biologicamente ativos utilizados no tratamento de infecções e neoplasias malignas. Além dos extratos das folhas, outras partes da planta devem ser estudadas utilizando-se novas formas de extração com o emprego de diversos solventes.

Para avaliação do potencial antimicrobiano, é imprescindível o desenvolvimento de testes em cepas de bactérias e fungos distintas daquelas utilizadas nesse trabalho, sendo os microrganismos presentes nas infecções respiratórias uma boa opção, tendo em vista que popularmente essa planta é utilizada no tratamento da tuberculose. A ação antiproliferativa da *Guapira Graciliflora* Mart. poderá ser testada em outras linhagens de células tumorais, como exemplo linhagens de câncer de mama (MCF 7), pulmão (NCI – H460), próstata (PC – 3) e colo do útero (HeLa).

A purificação do EOHG e separação de seus compostos, aliada a testes que elucidem de forma mais aprofundada, os mecanismos de ação responsáveis pela atividade antimicrobiana e antiproliferativa, desempenhada pela *Guapira Graciliflora* Mart., é de suma importância para seu futuro uso nas infecções orais e como quimioterápico no tratamento do CCEO.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Braz J Pharmacogn**, v. 18, n. 3, p. 472-508, Sep 2008.
- ALVES, P. M. et al In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Rev Soc Br Med Tropical**, v. 42, v. 2, p. 222-224, Abr 2009.
- ALVES-COSTA, C. P.; ETEROVICK, P. C. Seed dispersal services by coatis (*Nasuanasua*, Procyonidae) and their redundancy with other frugivores in southeastern Brazil. **Acta Oecologica**, v. 32, p. 77-92, 2007.
- AMIN, A. R. M. R. et al Perspectives for cancer prevention with natural compounds. **J Clin Oncol**, v. 27, p. 2712–2725, Feb 2009.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J Antimicrob Chemother**, v. 48, n. 1, p.5-16, 2001.
- AQUINO, F. G.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J. F. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado – Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 147-149, 2007.
- ASSOB, J. C. N. et al Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. **BMC Complement Altern Med**, v. 11, n.1, p. 70, 2011.
- BAJBOUJ, K. et al The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, n. 1, p. 69, 2012.
- BATISTA, A. C. et al Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod**, v. 109, n.3, p. 74-79, 2010.
- BIBI, Y. et al Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complement Altern Med**, v. 11, n. 1, p. 52-58, 2011.
- BRADFORD, M. M. Anal. **Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAY, F. et al Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 8, p. 790-801, Jun 2012.
- CEOLIN, T. et al Medicinal plants: knowledge transmission in families of ecological farmers in souther rio grande do sul. **Rev Esc Enferm USP**, v. 45, n. 1, p. 47-54, 2011.
- CHAVES, T.P. et al Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **Afr J Biotechnol**, v.12, n.8, p. 847-853, Feb 2013.



CHEON, K. et al Characteristics of Streptococcus mutans genotypes and dental caries in children. **Eur J Oral Sci**, v. 121, n. 31, p. 148–155, 2013.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard. 8 ed. CLSI document M07-A8. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 29, p. 9-49, 2009.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts**. Third Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F., SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia. Suplemento**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COSTA, J. G. M. et al Biological screening of araripe basin medicinal plants using Artemia salina Leach and pathogenic bactéria. **Pharmacogn Mag**, v. 6, n.24, p. 331–334, 2010.

DAHER, G. C. A.; PEREIRA, G. A.; OLIVEIRA, A. C. A. Características epidemiológicas de casos de câncer de boca registrados em hospital de Uberaba no período 1999-2003: um alerta para a necessidade de diagnóstico precoce. **Rev Bras Epidemiol**, v. 11, n. 4, p. 584-96. Dez 2008.

DESOTI, V. C. et al Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 3-13, Jan 2011.

DUBOIS, M. et al Colorimetric method for determination of sugar, and related substances. **Anal Chem**, v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

DZOYEM, J.P. Cytotoxic and antimicrobial activity of selected Cameroonian edible plants. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, n. 1, p. 78, 2013.

FATTAHI, S. et al Antioxidant and Apoptotic Effects of an Extract of Urtica dioica on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 9, p.5317-5323, 2013.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J. Biol. Chem**, v. 73, n. 2, p. 627–650, 1927.

FRANÇA, I. S. X. et al Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. **Rev Bras Enferm**, v. 61, n. 2, p. 201-8, Mar 2008.

HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 6, p. 88-92, Jun 2008.

HERRERA, A. H. et al Susceptibility of Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mutans to antibacterial effect from Mammea americana. **Adv Pharmac Scien**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

ISHIDA, K. et al Influence of tannins from *stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 1, p. 942–949, 2006.

JYOTHI, K.S.; SESHAGIRI, M. In-vitro activity of saponins of *Bauhinia purpu-rea*, *Madhuca longifolia*, *Celastrus paniculatus* and *Semecarpus anac-ardium* on selected oral pathogens. **J Dent (Tehran)**, v. 9, n. 4, p. 216–223, 2012.

KATARIA, H.; WADHWA, R.; KAUL, S.C.; KAUR, G. *Withania somnifera* Water Extract as a Potential Candidate for Differentiation Based Therapy of Human Neuroblastomas. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, e55316. doi:10.1371/journal.pone.0055316

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum.,1998, Vol.II.

LUO, J. et al. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of aryl-naphthalene lignans as potential anti-tumor agents. **PLoS ONE**, v.9, n.3, p. 93516, 2014.

MAHATA, S. et al. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 2, n. 1, p. 15, 2012.

MARREIRO, R.O. et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia férrea*. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 2014, n. 6, p. 9-13, 2014.

MARTINS. M. A. T. et al. Avaliação do conhecimento sobre o câncer bucal entre universitários. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, v. 37, n.4, p. 191-7, out-dez 2008.

MEDEIROS, L.C.M.; CABRAL, I.E. O cuidar com plantas medicinais: uma modalidade de atenção à criança pelas mães e enfermeira-educadora. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 18-26, Jan 2001.

MEHTA, R. G. et al Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come. **Pharm Res**, v. 27, n. 6, p. 950–961, Jun 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, Dec 1983.

MOTHANA, R. A. et al Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidante potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqotra. **BMC Complement Altern Med**, v. 9, n. 1, p. 7, Mar 2009.

NCUBE, B. et al Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **South Afr J Bot**, v. 79, p. 1-10, 2010.

- NEERGHEEN, V.S. et al Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, p. 229–241, 2010.
- NIELSEN, R.H. et al Antimicrobial activity of selected South African medicinal plants. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 74, 2012.
- OLIVEIRA, G. L. et al Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Bot Bras**, v. 24, n. 2, p. 571-577, 2010.
- OLIVEIRA, J. R. et al Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 208, 2013.
- OZI, J. M. et al In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Braz Oral Res**, v.25, n. 6, p. 519-525, 2011.
- PERAZZO, M. F. et al Antimicrobial effect of *Cymbopogon citratus* essential oil on dental biofilm-forming bacteria. **R Bras Ci Saúde**, v.16, n.4, p. 553-558, 2012.
- RAMOS, D. F. et al Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Braz J Pharm Scien**, v. 44, n. 4, Out 2008.
- REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev Esc Enferm**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.
- ROCHA, E. A. L. S. S. et al Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, v. 34, n. 3, p. 351-355, 2013.
- SANTOS, R.L. et al Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev Bras Pl Med**, v.13, n.4, p.486-491, Jul 2011.
- SARDI, J. C. O. et al New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - a brief review. **Archives of oral Biology**, v.56, n. 10, p. 951-959, 2011.
- SHIN, S. H. et al Therapeutic efficacy of halocidin-derived peptide HG1 in a mouse model of *Candida albicans* oral infection. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 5, p. 1152-1160, 2013.
- SILVA, S. R. S. et al Analysis of chemical constituents and antimicrobial activity of essential oil of *Mameluca alternifolia* Cheel. **Braz J Med Plants**, v. 6, p. 63-70, 2003.
- SIQUEIRA, C. Q. F. et al Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. **Evid-Based Compl Alt**, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- STEWART, P. et al Boonsiri. Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, n.1, p. 60, 2013.
- TALIB, W. H. et al Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*. **Molecules**, v.17, n. 12, p. 3291-3303, Mar 2012.

TAN, G. et al Biodiversity as a source of anticancer drugs. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 265-277, Mar 2006.

TOMAZZONI, M.I. et al Popular phytotherapy: the instrumental search as a therapy fitoterapia popular: la busca instrumental para el acto de la practica de la fitoterapia. **Texto Contexto Enferm**, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Braz J Pharm Scien**, v. 42, n. 2, p. 289- 306, Abr 2006.

UDEABOR, S. E. et al Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. **Head & Neck Oncology**, v. 4, n. 28, p. 1-7, 2012.

VAHABI, S. et al The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. **J Dent (Tehran)**, v. 8, p. 48-54, 2011.

VIOLANTE, I. M. P. et al Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 2012, p. 1302-1308, Jun 2012.

World Health Organization. **Infectious diseases**. Disponível em: [http://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/en](http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en), WHO, 2014.

WU, M. et al Isoalantolactone Inhibits UM-SCC-10A Cell Growth via Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 76000, Set 2013.

YANG, Y. et al Modulation of growth and angiogenic potential of oral squamous carcinoma cells in vitro using salvianolic acid. **BMC Complement Altern Med**, v. 11, n. 1, p. 54, 2011.

YEN, C.C. et al Anti-proliferative effect of methanolic extract of *Gracilaria tenuistipitata* on oral cancer cells involves apoptosis, DNA damage, and oxidative stress. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, n. 1, p.142, 2012.

# *Anexos*

## ANEXO A

BMC Complementary and Alternative Medicine

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

PREPARING MAIN MANUSCRIPT TEXT

### OVERVIEW OF MANUSCRIPT SECTIONS FOR RESEARCH ARTICLES

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Complementary and Alternative Medicine* should be divided into the following sections (in this order): Title page, Abstract, Keywords, Background, Methods, Results and discussion, Conclusions, List of abbreviations used, Competing interests, Authors' contributions, Authors' information, Acknowledgements, Endnotes, References, Illustrations and figures, Tables and captions, Preparing additional files.

#### TITLE PAGE

The title page should: provide the title of the article, list the full names, institutional, addresses and email addresses for all authors, indicate the corresponding author.

Please note: the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study". Abbreviations within the title should be avoided.

#### ABSTRACT

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: Background, the context and purpose of the study; Methods, how the study was performed and statistical tests used; Results, the main findings; Conclusions, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

#### KEYWORDS

Three to ten keywords representing the main content of the article.

## BACKGROUND

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

## METHODS

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

## CONCLUSIONS

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

## LIST OF ABBREVIATIONS

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

#### COMPETING INTERESTS

Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'. When completing your declaration, please consider the following questions: financial competing interests e non-financial competing interests.

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section.

#### AUTHORS' INFORMATION



You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

## ENDNOTES

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

## REFERENCES

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al*'. Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software: Examples of the *BMC Complementary and Alternative Medicine* reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *BMC Complementary and Alternative Medicine* reference style.

*Article within a journal:* Koonin EV, Altschul SF, Bork P: BRCA1 protein products: functional motifs. *Nat Genet* 1996, 13:266-267.

*Article within a journal supplement:* Orengo C A, Bray JE, Hubbard T, LoC onte L, Sillitoe I: Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. *Proteins* 1999, 43(Suppl 3):149-170.

*In press article:* Kharitonov SA, Barnes PJ: Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*, in press.

*Published abstract:* Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 1999, 42:s250.

*Article within conference proceedings:* Jones X: Zeolites and synthetic mechanisms. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

*Book chapter, or article within a book:* Schnepf E: From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

*Whole issue of journal:* Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): Innovative oncology. In *Breast Cancer Res* 1998, 10:1-72.

*Whole conference proceedings:* Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

*Complete book:* Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

*Monograph or book in a series:* Hunninghake GW, Gadek JE: The alveolar macrophage. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

*Book with institutional author:* Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

*PhD thesis:* Kohavi R: Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

*Link / URL:* The Mouse Tumor Biology Database [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]

*Link / URL with author(s):* Corpas M: The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values [http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/].

*Dataset with persistent identifier:* Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C -M; Jing, H-C (2011): Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

*Clinical trial registration record with persistent identifier:* Mendelow, AD (2006): Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage. Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

## PREPARING ILLUSTRATIONS AND FIGURES

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

## FIGURE LEGENDS

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

## PREPARING TABLES

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be

highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author. Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

## STYLE AND LANGUAGE

### *General*

Currently, *BMC Complementary and Alternative Medicine* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. *BMC Complementary and Alternative Medicine* will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

## LANGUAGE EDITING

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends Edanz. BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact Edanz directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

## HELP AND ADVICE ON SCIENTIFIC WRITING

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on Writing titles and abstracts for scientific articles. Tim Albert has produced for BioMed Central a list of tips for writing a scientific manuscript. American Scientist also

provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the BioMed Central author academy.

## ABBREVIATIONS

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

## TYPOGRAPHY

Please use double line spacing. Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks. Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.

Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title. All pages should be numbered. Use the *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Please do not format the text in multiple columns. Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

## ANEXO B

Molecules

### MANUSCRIPT PREPARATION

*Paper Format:* A4 paper format, the printing area is 17.5 cm x 26.2 cm. The margins should be 1.75 cm on each side of the paper (top, bottom, left, and right sides). There is no page limit. Full experimental details (for original research papers) must be provided so that the results can be reproduced.

*Formatting / Style:* The paper style of *Molecules* should be followed. You may download a template file from the *Molecules* homepage to prepare your paper. It is not necessary to follow the manuscript structure showed in the template file for review papers.

*Authors List and Affiliation Format:* Authors' full first and last names must be given. Abbreviated middle name can be added. For papers written by various contributors a corresponding author must be designated. The PubMed/MEDLINE format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, country, and email address should be added. All authors who contributed significantly to the manuscript (including writing a section) should be listed on the first page of the manuscript, below the title of the article. Other parties, who provided only minor contributions, should be listed under Acknowledgments only. A minor contribution might be a discussion with the author, reading through the draft of the manuscript, or performing English corrections.

*Abstract and Keywords:* The abstract should be prepared as one paragraph of about 200 words. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work, its purpose, the main methods or treatments applied; summarize the article's findings or facts and indicate the authors' conclusions or interpretation. As such, the abstract aims at being an objective representation of the article and must not contain results or data which are not presented and substantiated in the main text. Note that abstracts serve two main purposes: on one hand abstracts are used by potential readers to assess the relevancy of an article for their own work. On the other hand, abstracts are used by indexing databases to catalog articles appropriately. Also, three to 10 pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the abstract and the keyword list use words that are specific to the article yet reasonably common within the subject discipline.

*Abstract Graphic:* Authors are encouraged to provide a self-explanatory graphical abstract of the paper to be used along with the abstract on the Table of Contents and search results. The

graphic should not exceed 550 pixels width/height and can be provided as a PDF, JPG, PNG or GIF file. The minimum text size in the graphic should be 12 pt.

*Units:* SI units (International System of Units) should be used for this journal. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible before submission of a manuscript to the journal.

*Figures, Schemes and Tables:* Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color. Full color graphics will be published free of charge. We kindly request authors to provide figures and schemes at a sufficiently high resolution (min. 600 pixels width, 300 ppi). Figures and schemes must be numbered (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, etc.) and an explanatory title must be added. Tables should be inserted into the main text, and numbers and titles for all tables supplied. All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but in no case should these be less than 10 pt in size. Authors should use the Table option of MS Word to create tables, rather than tabs, as tab delimited columns are often difficult to format for the final PDF output. Please supply captions for all figures, schemes and tables. The captions should be prepared as a separate paragraph of the main text and placed in the main text before a table, a figure or a scheme.

*Equations:* If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on in your paper. It should be editable, not in the format of a picture.

*Chemical Structures and Reaction Schemes:* Chemical structures and reaction schemes should be drawn using an appropriate software package designed for this purpose. As a guideline, these should be drawn to a scale such that all the details and text are clearly legible when placed in the manuscript (i.e. text should be no smaller than 8-9 pt.). To facilitate editing we recommend the use of any of the software packages widely available for this purpose: MDL® Isis/Draw, ACD/ChemSketch®, CS ChemDraw®, ChemWindow®, etc. Free versions of some of these products are available for personal or academic use from the respective publishers. If another less common structure drawing software is used, authors should ensure the figures are saved in a file format compatible with one of these products.

*Physical and Spectroscopic Data:* Physical and spectroscopic data as well as tables for NMR data should be prepared according to the ACS's *Preparation and Submission of Manuscripts* standard (page 4).

*Experimental Data:* To allow for correct abstracting of the manuscripts all compounds should be mentioned by correct chemical name, followed by any numerals used to refer to them in the paper. The use of the IUPAC nomenclature conventions is preferred, although alternate



naming systems (for example CAS rules) may be used provided that a single consistent naming system is used throughout a manuscript. For authors perhaps unfamiliar with chemical nomenclature in English we recommend the use of compound naming software such as AutoNom. Full experimental details must be provided, or, in the case of many compounds prepared by a similar method, a representative typical procedure should be given. The general style used in the Journal of Organic Chemistry is preferred. Complete characterization data must be given for all new compounds. For papers mentioning large numbers of compounds a tabular format is acceptable. For known compounds appropriate literature references must be given.

*X-Ray Crystallographic Data:* to avoid publication of extensive compilations of crystallographic data and facilitate the refereeing of manuscripts, *Molecules* asks authors to deposit the crystallographic data prior to the submission of the manuscript.

*COD:* Preferably, the data should be deposited with the Crystallography Open Database (COD). Please deposit as "prepublication data" at [http://www.crystallography.net/initiate\\_deposition.php](http://www.crystallography.net/initiate_deposition.php) prior to the submission of the manuscript. COD numbers for structures will be displayed immediately after the data is validated and deposited, and should be included in the manuscript, along with the following text: "COD ..... contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.crystallography.net/search.html>". This text may be included in the experimental section or as a suitably referenced endnote.

*CCDC:* Alternatively, the data can be deposited to the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). For instructions on doing this, see: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/depositing.html>. The deposition numbers are usually provided by the CCDC within three working days and should be included in the manuscript, along with the following text: "CCDC ..... contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; Fax: +44 1223 336033; E-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk))". This text may be included in the experimental section or as a suitably referenced endnote.

*Conflicts of Interest:* Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflicts of Interest"

statement immediately preceding the "References" section of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under the "Acknowledgments" section.

*Acknowledgments:* Please clearly indicate grants that you have received in support of your research work (including funds for covering the costs to publish in open access). Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly identified in the paper. The Acknowledgments section is placed just before the References section.

*References:* Please ensure that a comprehensive list of all relevant references is provided at the end of the manuscript, and that all references are cited within the paper and numbered consecutively throughout the paper (including citations in tables and legends).

References should preferably be prepared with a bibliography software package, such as Zotero, EndNote or ReferenceManager. If references are prepared manually they must be checked for integrity and correctness.

*Reference Formatting:* All the references mentioned in the text should be listed separately and as the last section at the end of the manuscript, and be numbered consecutively throughout the paper. Do not repeat references in the references list. Reference numbers should be placed in square brackets [ ], and placed before the punctuation; for example [4] or [1-3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). Or [6] (pp. 101–105). Include the full title for cited articles. See the Reference Preparation Guide for more detailed information.

*Supplementary Material and Research Data:* authors are encouraged to make their experimental and research data openly available. Large datasets and files should be deposited to specialized data repositories. Small datasets, spreadsheets, images, video sequences, conference slides, software source code, *etc.* can be included with the submission and published as supplementary material. Please read the information about Supplementary Material and Data Deposit beneath for additional information and instructions.

## AUTHORSHIP AND AUTHORS CONTRIBUTIONS

For research articles with more than one author, authors are asked to prepare a short, one paragraph statement giving the individual contribution of each co-author to the reported research and writing of the paper. The paragraph should be titled "Author Contributions" and placed in the paper after the "Acknowledgment" section and before the "Conflicts of Interest"

statement. Only major contributors should be listed as authors. Those with small or technical contributions can be mentioned in the Acknowledgment section. Authors themselves are responsible for the correct identification and attribution of authorship. According to the COPE standard, to which this journal adheres, "all authors should agree to be listed and should approve the submitted and accepted versions of the publication. Any change to the author list should be approved by all authors including any who have been removed from the list. The corresponding author should act as a point of contact between the editor and the other authors and should keep co-authors informed and involve them in major decisions about the publication (e.g. responding to reviewers' comments)." [1]

1. Wager, E.; Kleinert, S. Responsible research publication: international standards for authors. A position statement developed at the 2nd World Conference on Research Integrity, Singapore, July 22-24, 2010. In *Promoting Research Integrity in a Global Environment*; Mayer, T., Steneck, N., eds.; Imperial College Press / World Scientific Publishing: Singapore; Chapter 50, pp. 309-16.

#### CORRECT IDENTIFICATION OF COMPONENTS OF NATURAL PRODUCTS

The correct identification of the various components of extracts from natural sources is of key importance, and as publishers we are keenly aware of our responsibility to the scientific community in this area. Consequently, for papers on this topic, we have adopted the recommendations of the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavour Industry (IOFI), as published in *Flavour Fragr. J.* 2006, 21, 185. These recommendations may be summarized as follows: Any identification of a natural compound must pass scrutiny by the latest forms of available analytical techniques. This implies that its identity must be confirmed by at least two different methods, for example, comparison of chromatographic and spectroscopic data (including mass, IR and NMR spectra) with those of an authentic sample, either isolated or synthesized. For papers claiming the first discovery of a given compound from a natural source, the authors must provide full data obtained by their own measurements of both the unknown and an authentic sample, whose source must be fully documented. Authors should also consider very carefully potential sources of artifacts and contaminants resulting from any extraction procedure or sample handling.

#### POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflicts of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section.

## PEER-REVIEW AND EDITORIAL PROCEDURE

### *Initial Check*

All submitted manuscripts are received by the Editorial Office. The in-house *Managing Editor* will perform a preliminary check of the manuscript to assess if: it suits the scope of the journal, whether it is properly prepared, and whether the manuscript follows the ethical policies of the journal. In case of doubt, the *Managing Editor* may consult with the journals' *Editor-in-Chief* or an Editorial Board member.

Manuscripts that do not fit the journal or are not in line with our ethical policy may be rejected before peer-review. Manuscripts that are not properly prepared will be returned to the authors for revision and resubmission.

### *Expert Peer-Review*

Once a manuscript passes the initial check, it will be assigned to several independent experts for peer-review. A single-blind peer-review process is applied, where authors names are revealed to reviewers. Experts may include past and present Editorial Board members and Guest Editors of the journal. However, we also actively seek other experts, which are identified during literature searches. Potential referees suggested by the authors are also carefully considered. As a general rule, referees should not have published with one or more of the co-authors during the past five years and should not currently work or collaborate with one of the institutes of the co-authors of the manuscript under consideration. At least two expert opinions will be collected for each manuscript.

### *Revisions and Editorial Decision*

Based on the comments from the outside referees, the Editorial Office will usually ask the authors for minor or major revisions. If the comments are either very positive or very negative, the Editorial Office may directly ask the academic editor (usually the *Editor-in-Chief* or a *Guest Editor*) for a decision. Otherwise, the manuscript will be sent back to the authors for minor or major revisions. In case of minor revisions, the Editorial Office will ask the academic editor for a final decision on the revised version of the manuscript. In case of major revisions, the manuscript will usually be sent back to one or more of the outside referees before sending the paper to the academic editor for a decision. We allow a maximum of two rounds of major revisions.

### *Author Appeals*

Authors may appeal editorial decisions by sending an e-mail to the Editorial Office of the journal. The *Managing Editor* of the journal will forward the manuscript and relating information (including the identities of the referees) to an appropriate Editorial Board member of the journal. If no appropriate Editorial Board member is available, the editor will identify a suitable external scientist. The Editorial Board member may judge the paper by himself or request additional expert opinions to judge the manuscript. The Editorial Board member will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript. If the manuscript is rejected based on the Editorial Board member review, the decision will be final and cannot be revoked.

### *Production and Publication*

Once accepted, a manuscript will undergo our standard production procedure. This entails professional copy-editing of the paper, English editing, proofreading by the authors, final corrections, pagination and publication on the [www.mdpi.com](http://www.mdpi.com) website.

### PEER-REVIEW / REFEREES

During the submission process, authors can suggest potential referees with the appropriate expertise to review the manuscript. The editors will not necessarily approach these referees. Please provide as detailed contact information as possible (address, homepage, phone, email

address). The proposed referees should be experts in the field who can provide an objective report—they should not be current collaborators of the co-authors nor have published with any of the co-authors of the manuscript within the last 5 years. Proposed referees should be from different institutions to the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential referees. Another possibility is to select referees from among the authors that you frequently cite in your paper.

#### ENGLISH CORRECTIONS

This journal is published in English, so it is essential that for proper refereeing and quick publication all manuscripts are submitted in grammatically correct English. If you are not a native English speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission or read by a native English-speaking colleague. Professional editing will mean that reviewers are better able to read and assess your manuscript. For additional information see the English Editing Guidelines for Authors.

#### PUBLICATION ETHICS STATEMENT

*Molecules* is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). The editors of this journal take the responsibility to enforce a rigorous peer-review process together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, image manipulation, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. The editors of *Molecules* take such publishing ethics issues very seriously and are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

Authors wishing to publish their papers in *Molecules* are asked to abide to the following rules: Authorship and authors' contributions to the paper need to be fully and accurately disclosed. Any facts that might be perceived as a possible conflict of interest of the author(s) need to be disclosed in the paper prior to submission. All funding of the research needs to be precisely disclosed. Authors should accurately present their research findings and include an objective discussion of the significance of their findings. Data and methods used in the research need to be presented in sufficient detail in the paper, so that other researchers can replicate the work. Raw data should preferably be publicly deposited by the authors before submission of their manuscript. At least, authors need to have the raw data readily available for presentation to the referees and the editors of the journal, if requested. Authors need to ensure appropriate

measures are taken so that raw data is retained in full for a reasonable time after publication. Plagiarism, data fabrication and image manipulation are not tolerated. Simultaneous submission of manuscripts to more than one journal is not tolerated. Republishing content that is not novel is not tolerated (for instance, an English translation of a paper that is already published in another language is not tolerated). If errors and inaccuracies are found by the authors after publication of their paper, those need to be promptly communicated to the editors of this journal, so that editors can issue a correction, amendment or retraction of the paper.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL DEPOSIT

In order to maintain the integrity, transparency and reproducibility of research records, and to retain important chemical and structural information, authors are strongly encouraged to make their experimental and research data openly available either by depositing into data repositories or by publishing the data and files as supplementary information in this journal. Supplementary data and files can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will be offered to the referees as part of the peer-review process, although referees are not specifically asked to review supplementary files. Accepted file formats include (but are not limited to): spectral data (NMR, IR, Raman, ESR, etc.) in JCAMP (JDX) format, 3D coordinate structures (in PDB, MOL, XYZ or other common format), crystallographic information (in CIF format), data tables and spreadsheets (text files, MS Excel, OpenOffice, CSV, XML, etc.), text documents (text files, PDF, MS Word, OpenOffice, etc.; text documents will be preferably converted to PDF files for the publication), images (JPEG, PNG, GIF, TIFF, BMP, etc.), videos (AVI, MPG, QuickTime, etc.), executables (EXE, Java, etc.), software source code.

Large data sets and files should be deposited to specialized service providers (such as Figshare) or institutional/subject repositories, preferably those that use the DataCite mechanism. For a list of specialized repositories for the deposit of scientific and experimental data, please consult [databib.org](http://databib.org) or [re3data.org](http://re3data.org). The data repository name, link to the data set (URL) and accession number, doi or handle number of the data set must be provided in the paper. The journal *Data* (ISSN 2306-5729) is also accepting submissions of data set papers, and the publication of small data sets and/or software source code along with the paper is encouraged.