



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**DIEGO ROMÁRIO DA SILVA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME CONTRA ESPÉCIES DE *Candida*  
E TOXICIDADE DA *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan**

**CAMPINA GRANDE-PB**

**2017**

**DIEGO ROMÁRIO DA SILVA**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME CONTRA ESPÉCIES DE *Candida*  
E TOXICIDADE DA *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan**

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

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa

**CAMPINA GRANDE-PB**

**2017**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução 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.

S586p Silva, Diego Romário da.  
Potencial antifúngico e antibiofilme contra espécies de Candida e toxicidade in vitro e in vivo da Anadenanthera colubrina vell. Brenan [manuscrito] / Diego Romário da Silva. - 2017.  
72 p. : il. color.

Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. Anadenanthera colubrina vell. Brenan. 2. Plantas medicinais. 3. Ação antimicrobiana. 4. Candidíase. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

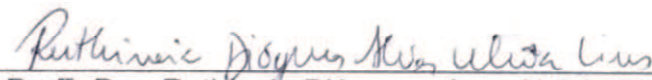
**DIEGO ROMÁRIO DA SILVA**

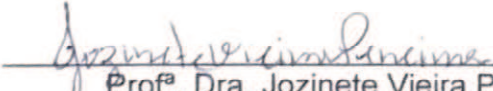
**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME CONTRA ESPÉCIES DE *Candida*  
E TOXICIDADE DA *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan**

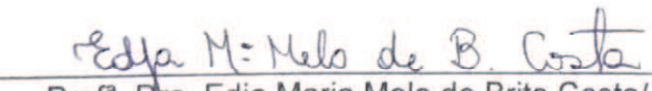
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**Aprovado em : 21/02/2017**

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ruthineia Diógenes Aves Uchôa Lins / UFRN  
(Examinador externo)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jozinete Vieira Pereira / UEPB  
(Examinador interno)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa / UEPB  
Membro titular (Orientadora)



Aos meus amados pais, Arilânia e José, pelo carinho, pelo investimento em minha educação e pelo apoio que me dá forças para continuar nesta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, criador de tudo que existe, que proporcionou que todas as coisas acontecessem no lugar e no momento certo para que eu pudesse estar escrevendo este texto hoje. Nos momentos de dúvida, incertezas e tristezas foi minha fé que me manteve disposto a continuar.

Aos meus queridos e amados pais, Arilânia e José pelo amor, dedicação e carinho de sempre. Obrigado por colocarem meus sonhos e minha educação como prioridade. Até aqui eu ainda caminhei pouco, mas tenho a esperança de que irei longe e tudo de bom que aconteceu e acontecerá está diretamente ligado à dedicação de vocês. Uma nova jornada está por vir e, desta vez, terá o peso da distância. Mas tenho fé em Deus que venceremos mais uma vez e que no futuro poderei retribuir tudo que fizeram por mim.

Às minhas queridas irmãs, Amanda e Vitória. Duas verdadeiras amigas que sempre estiveram dispostas a me ajudar nesta caminhada. Obrigado por todo o carinho, apoio e dedicação. Os nossos risos, brigas e loucuras são momentos muito especiais, que me fazem sentir vivo. Que Deus conserve para sempre essa nossa parceria e cumplicidade.

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Edja Costa, um ser humano iluminado e cheio de paz que Deus colocou em minha vida. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho e por acreditar no meu potencial. A nossa convivência me proporcionou não só grande aprendizado mas também me lançou muito além do que eu imaginava ir. Serei eternamente grato por todas as oportunidades que me concedeu. Convivemos pouco tempo, menos do que gostaria de ter convivido com a senhora, mas foi suficiente para saber que deste convívio ficará uma amizade que levarei por toda a vida.

À minha orientadora da graduação e, hoje, grande amiga Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Silva. Apesar de não ter mais nenhuma obrigação acadêmica comigo, esteve sempre presente. Obrigado pelos conselhos, pelas vezes em que me ouviu e por sua amizade. Foi quem me inspirou a iniciar esta jornada acadêmica e onde quer que eu vá serei grato por ter me aberto este caminho.

À minha amiga, Juliana Cândido, por todos esses anos de convivência. Entre brigas e risos, conviver esses seis anos foi um prazer imenso. Sei que nossa amizade será para a vida toda. Obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba e a todos os professores, pelo compromisso e dedicação com a formação de seus alunos.

A todos os meus colegas de turma do mestrado, especialmente os mais próximos: Liege Helena e Fabiana Medeiros (Doutorado), obrigado pelo companherimos, por serem meu ponto de equilíbrio e por serem as pessoas mais “topadas”. Erick Tássio, obrigado pela parceria, pelas caronas e pelas conversas doidas que ajudavam a fugir da realidade. Niebla Melo e Alencar Neto, pelo companheirismo de sempre, pelas ótimas conversas e por sempre estarem dispostos a ajudar em tudo. À Ana Priscila, pelo bom humor que nos contagia, pelas caronas e pelos bolos e biscoitos que sempre levava para a aula. Obrigado a todos pelos risos, pelo incentivo e pela convivência harmoniosa. Obrigado por todas as vezes que ouviram meus “aperreios”, que aguentaram meu humor atípico e minha linguagem hiperbólica.

À Prof<sup>a</sup>. Ana Flávia pelo carinho, por me ensinar a gostar de epidemiologia e por arrancar sorrisos de mim mesmo em dias tristes e difíceis. Não existe PPGO-UEPB sem você.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Jozinete Pereira, pelo carinho de sempre, pelo incentivo, pelo comprometimento que tem com a educação dos seus alunos e por aceitar participar da minha banca de defesa de mestrado.

Às minhas colegas de grupo de pesquisa Carolina Medeiros e Rennaly Lima pela parceria, pelas ajudas no laboratório e pelas boas risadas de sempre. O pouco tempo que passamos juntos foi suficiente para perceber que fui muito sortudo em ter pessoas tão iluminadas ao meu lado. Que nossa amizade e parceria permaneça perdure por toda a vida.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), nas pessoas do Prof. Pedro Rosalen e dos queridos amigos Irlan Freires, Janaína Sardi e Josy Lazarini. Conviver com vocês foi uma oportunidade maravilhosa de obter novos conhecimentos, além de ganhar amigos que quero ter por toda a vida.

À Letícia, pessoa mais engraçada que já entrou no nosso laboratório, e às meninas da iniciação científica: Tereza Vieira, Paolla Raimundy, Arella Brito, Priscilla Guimarães e Yanne Marinheiro, que apesar da vida conturbada nas clínicas da graduação estiveram sempre presentes e dispostas a ajudar no laboratório.

À querida amiga Dione por deixar nosso laboratório sempre organizado e limpo e pelas conversas que sempre alegravam meu dia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pelas oportunidades e pelo auxílio financeiro que tornaram viável a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Este estudo avaliou o potencial antifúngico e antibiofilme do extrato hidroalcoólico da casca da *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan, conhecida como angico e angico branco. A atividade antifúngica foi inicialmente avaliada pela técnica da microdiluição em caldo com obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). O potencial antibiofilme foi testado em biofilmes maduros formados por espécies de *Candida* e analisados por contagem de UFC/mL e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A toxicidade *in vitro* foi analisada em macrófagos Raw 264.7 e a toxicidade sistêmica foi avaliada *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*. Observou-se um forte potencial antifúngico do extrato contra cepas do gênero *Candida*, obtendo-se os seguintes valores da CIM: *Candida albicans* ATCC 5314 e ATCC 90028 (19.5 µg/mL), *Candida tropicalis* ATCC 750 (5000 µg/mL), *Candida glabrata* ATCC 90030 (1250 µg/mL), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 (39 µg/mL). O tratamento com o extrato reduziu o número de UFC/mL e foi capaz de causar alteração estrutural no biofilme e destruição celular, observadas em MEV, apresentando uma promossa atividade antibiofilme contra *Candida*. *A. colubrina* apresentou moderada toxicidade *in vitro* em cultura de macrófagos RAW 264.7. No ensaio *in vivo* o extrato não afetou a viabilidade das larvas em doses abaixo de 100 mg/kg, apresentando baixa toxicidade. Considerando seu alto potencial antifúngico e sua baixa toxicidade *in vivo*, o extrato de *A. colubrina* é um forte candidato para o desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento da candidíase oral.

**Palavras-chaves:** *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan. Plantas medicinais. Produtos com ação antimicrobiana.

## ABSTRACT

This study evaluated the antifungal and antibiofilm potential of the hydroalcoholic extract of the bark of *Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan, known as Angico and White Angico. The antifungal activity was initially evaluated by the microdilution technique in broth with minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (CFM). The potential antibiofilm was tested in mature biofilms formed by *Candida* species and analyzed by counts of CFU / mL and scanning electron micrograph (SEM). In vitro toxicity was analyzed in RAW 264.7 macrophages and systemic toxicity was evaluated in vivo in the *Galleria mellonella* model. A strong antifungal potential of the extract against strains of the genus *Candida* was observed, with the following MIC values: *Candida albicans* ATCC 5314 and ATCC 90028 (19.5 µg / mL), *Candida tropicalis* ATCC 750 (5000 µg / mL), *Candida Glabrata* ATCC 90030 (1250 µg / ml), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 (39 µg / ml). The treatment with the extract reduced the number of CFU / mL and was able to cause structural alteration in the biofilm and cellular destruction, observed in SEM, presenting a promising antibiofilm activity against *Candida*. *A. colubrina* presented moderate toxicity in vitro in RAW 264.7 macrophages culture. In the in vivo assay the extract did not affect the viability of the larvae at doses below 100 mg / kg, presenting low toxicity. Considering its high antifungal potential and its low in vivo toxicity, *A. colubrina* extract is a strong candidate for the development of a new drug for the treatment of oral candidiasis.

**Keywords:** *Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan Medicinal plants. Products with antimicrobial action.

## LISTA DE SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DL <sub>50</sub>	Dose letal 50
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NaCl	Cloreto de sódio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
UFC	Unidade Formadora de Colônia
YNB	Yeast nitrogen base

## LISTA DE IMAGENS

**Figura 1:** Visão geral de *A. colubrina* (A), do seu tronco (B), frutos (C) e flores (D). (Imagem 1D - Fonte: Vinícius Lumbambo - [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Angico/anadenantheracolubrinavellbrenan.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Angico/anadenantheracolubrinavellbrenan.html)).

**Figura 2:** Sequência metodológica do estudo.

**Lista de imagens que constam no artigo: POTENCIAL ANTIBIOFILME CONTRA ESPÉCIES DE *Candida* E TOXICIDADE *in vitro* E *in vivo* DA *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan (ANGICO):**

**Figura 1:** Atividade antibiofilme do extrato de *A. colubrina*: Efeito de *A. colubrina* (A) nas concentrações de 1950 µg/mL (100 vezes a CIM) e 9750 µg/mL (500 vezes a CIM) sobre *C. albicans* ATCC 5314 (**Figura 1A**) e *C. albicans* 90028 (**Figura 1B**), na concentração de 50000 µg/mL (10 vezes a CIM) sobre *C. tropicalis* ATCC 750 (**Figura 1C**), na concentração de 12500 µg/mL (10 vezes a CIM) sobre *C. glabrata* ATCC 90030 (**Figura 1D**), na concentração de 3900 µg/mL (100 vezes a CIM) e 19500 µg/mL (500 vezes a CIM) sobre a *C. parapsilosis* 22019 (**Figura 1E**) e a *C. krusei* ATCC 6258 (**Figura 1F**). Os isolados clínicos frescos de *C. albicans* foram tratados com *A. colubrina* na concentração de 1950 µg/mL (100 vezes a CIM) e 9750 µg/mL (500 vezes a CIM) para o isolado clínico 01 (**Figura 1G**) e na concentração de 3900 µg/mL (100 vezes a CIM) e 19500 µg/mL (500 vezes a CIM) para o isolado clínico 02 (**Figura 1H**). Controle negativo (C) e a nistatina (N) (100 vezes a CIM encontrada para cada cepa).

**Figura 2:** Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028, mostrando a morfologia celular. Controle negativo, aumento 500x (**Figura 2A**) e 5000x (**Figura 2B**), evidenciando a morfologia normal das leveduras e hifas. Biofilme tratado com *A. colubrina* 1950 µg/mL (100 vezes a CIM) (**Figura 2C: 500x; Figura 2E: 5000x**) e 9750 µg/mL (500 vezes a CIM) (**Figura 2D, 500x; Figura 2F: 5000x**) mostrando a desintegração do biofilme e destruição celular.



**Figura 3:** Porcentagem da viabilidade celular (RAW 264.7) quando tratadas com extrato de *A. colubrina* (Figura 3A) e nistatina (Figura 3B). Os dados do grupo controle meio de cultura (M) foram normalizados para 100% e utilizados como controle negativo. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

**Figura 4:** Toxicidade sistêmica *in vivo*, em *Galleria mellonella*, do extrato de *A. colubrina* e da nistatina. Para *A. colubrina* foram usadas doses crescentes de 50 mg/kg a 10 g/kg (**Figura 4A**) e para a nistatina de 5 mg/kg a 2.5 g/kg (**Figura 4B**).

**Lista de imagens que constam no apêndice A: Detalhamento metodológico:**

**Figura 1:** Imagens gerais dos procedimentos com *Galleria mellonella*. (A). Recipiente onde as larvas são armazenadas. (B) Injeção da amostra na última pró-pata esquerda. (C) Armazenamento das larvas em placas descartáveis para posterior incubação. (D) Larvas com processo de melanização completo, indicando a sua morte e a toxicidade da dose utilizada.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Distribuição dos valores das concentrações inibitória mínima e fungicida mínima do extrato da *A. colubrina*, de acordo com a espécie de *Candida*.

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	14
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 Candidíase.....	15
2.2 Candida, um patógeno humano.....	15
2.3 Antifúngicos.....	18
2.4 Plantas medicinais: fonte de princípios ativos com atividade biológica.....	19
2.5 <i>Anadenanthera colubrina</i> vell. Brenan.....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	23
4.1 CARACTERIZAÇÃO E SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DO ESTUDO.....	23
4.2 LOCAL DO ESTUDO.....	23
<b>5. RESULTADOS (ARTIGO)</b> .....	24
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO..	26
2.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE MICRORGANISMOS.....	26
2.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME.....	27
2.4 CULTURA CELULAR E ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	27
2.5 TOXICIDADE SISTÊMICA <i>in vivo</i> EM MODELO DE <i>Galleria mellonella</i> .....	28
2.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....;	30
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
3 RESULTADOS.....	30
4 DISCUSSÃO.....	35
5 CONCLUSÃO.....	40
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45

### REFERÊNCIAS

Apêndice A – Detalhamento da metodologia

Anexo A – Normas do periódico Archives of Oral Biology

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A candidíase oral é uma infecção mucocutânea oportunista causada por fungos do gênero *Candida*. Sua ocorrência está associada ao desequilíbrio no organismo, decorrente de alterações locais ou sistêmicas. A depender das condições sistêmicas do hospedeiro, esta infecção pode evoluir para uma infecção sistêmica. A candidemia é uma infecção nosocomial que interfere na qualidade de vida do paciente por causar morbidade e mortalidade, o que implica em um expressivo problema de saúde pública. Atualmente sinaliza-se o surgimento de espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos disponíveis no mercado. Esse limitado arsenal de antifúngicos e sua toxicidade considerável, torna-se urgente a busca por novas fontes de princípios ativos para o tratamento da candidíase. As plantas medicinais e aromáticas possuem inúmeras moléculas capazes de realizar diversas atividades biológicas no organismo (LIU et al., 2016). Desse modo, são uma importante fonte de busca para novas alternativas terapêuticas.

O extrato de *A. colubrina* foi analisado anteriormente por nosso grupo de pesquisa (LIMA et al., 2014; NUNES et al., 2015), em que foi considerado como um extrato com forte potencial antifúngico para *Candida albicans*. Neste estudo, guiado pelos trabalhos anteriores, ampliamos as análises para espécies não-*albicans* e a toxicidade do extrato em estudo *in vitro* e *in vivo*, a fim de proporcionar informações iniciais acerca da segurança no seu uso.

A maioria dos estudos que buscam avaliar o potencial antifúngico de possíveis novas fontes terapêuticas para o tratamento da candidíase oral usa, de forma generalizada e como padrão, a espécie *C. albicans*. Embora seja relatado que esta espécie é a mais presente na cavidade oral de humanos e a maior responsável por casos de fungemia, sabe-se que as espécies não-*albicans* estão cada vez mais presentes. Dessa forma, é importante que os estudos que buscam novas alternativas para o tratamento da candidíase oral tenham a intenção de mostrar a atividade antifúngica também contra as espécies não-*albicans*: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (PAPON et al., 2013).

O objetivo desse trabalho foi avaliar se a ação antifúngica e antibiofilme *in vitro* do extrato de *A. colubrina* estende-se para diferentes espécies do gênero *Candida*, assim como avaliar em modelo *in vitro* e *in vivo* se o seu nível de

toxicidade é baixo o suficiente para considerar o seu uso no tratamento da candidíase oral.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Candidíase oral

O aparecimento de infecções fúngicas intensificou-se nos últimos anos, principalmente nos indivíduos com deficiências imunológicas ou que apresenta outro fator de risco, como, câncer e o uso de dispositivos invasivos ou de drogas antibacterianas (SARDI et al., 2013). Dentre essas infecções, destaca-se a candidíase, especialmente, a candidíase oral, por representar uma das infecções oportunistas mais ocorrentes em humanos (HANI et al., 2015). Pode ser assintomática ou produzir alguns sintomas, como: alteração no paladar, ardor, sensação dolorosa e dificuldade de deglutição (HOSHI et al., 2011; BAKHSHI et al., 2012).

Em portadores de próteses dentárias removíveis, a presença de *Candida* aumenta consideravelmente (SALERNO et al., 2011). A explicação para esse aumento está no fato das próteses totais diminuírem o fluxo de oxigênio na interface prótese-mucosa, produzindo um microambiente ácido e anaeróbico, favorável ao crescimento de levedura (GLEIZNYS, ZDANAVIČIENĖ e ŽILINSKAS, 2015), e conseqüentemente da infecção, com ocorrência em mais 65% dos usuários de prótese (WILIAMS e LEWIS, 2011). Além da *Candida albicans*, outras espécies podem estar envolvidas no desenvolvimento da candidíase oral, como, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis* (DANGI, SONI e NAMDEO, 2010; MAUBON et al., 2014).

### 2.3 *Candida*, um patógeno humano

Como os demais fungos, a *Candida* é um organismo não fotossintético, eucarioto e com uma parede celular envolvendo a membrana plasmática. Trata-se de um fungo polimorfo, podendo se desenvolver na forma de leveduras (células redondas), na forma de pseudo-hifas (células elipsoides com constrição em seus septos) e na forma de hifas verdadeiras (células em formato filamentoso e sem constrição visível) (POLKE, HUBE e JACKOBSEN, 2015). A sua reprodução ocorre por processo de brotamento, em que saliências protoplasmáticas emergem da célula

mãe e crescem para formar uma nova célula. Em alguns casos, as células-filhas, ocasionalmente, não se separam e formam as pseudo-hifas (CORONADO-CASTELLOTE e JIMÉNEZ-SORIANO, 2013).

Além da capacidade de formar hifas, a *C. albicans* apresenta outros fatores de virulência, que lhe concedem características importantes para sua sobrevivência, crescimento e estabelecimento de infecções, em que incluem secreção de proteinases, fosfolipases e expressão de adesinas de superfícies (BRAND e GOW, 2011). Esta habilidade de crescer na forma de hifas protege a *C. albicans* de possível fagocitose pelas células do hospedeiro e proporciona a invasão em superfícies epiteliais. Por outro lado, tanto as formas de hifas como as leveduras podem ser encontradas nas infecções sistêmicas por *Candida*. Observa-se, no entanto, que as leveduras estão mais relacionadas ao processo de difusão através da corrente sanguínea, enquanto que a formação de hifas está mais associada à invasão nos tecidos (JACOBSEN et al., 2012).

As espécies de *Candida* podem crescer e formar biofilmes, tanto em superfícies mucocutâneas como em superfícies abióticas, como as próteses. O biofilme concede ao microrganismo resistência à remoção mecânica pelo fluxo salivar, resistência a moléculas de defesa do indivíduo e fármacos, o que pode favorecer a disseminação. A presença de bactérias orais nos biofilmes de *Candida*, tendem a aumentar o poder de infecção desses fungos (CAVALCANTI et al., 2015).

A formação de biofilme inicia com a adesão de células de levedura a um substrato. Essas células formam filamentos que se estendem pelo substrato e uma matriz extracelular é secretada. Com o aumento da divisão celular e da secreção de matriz é formado um biofilme maduro (RAMAGE et al., 2012; INGLIS e SHERLOCK, 2013). A filamentação pode aparecer como um mecanismo de fuga ou como uma alternativa ao movimento. Dessa forma, o crescimento, que resulta na filamentação, é orientado por um sinal de tropismo ou por meio de barreiras em direção a um ambiente diferente (BRAND e GOW, 2009). Deste modo, as alterações no ambiente oral podem favorecer o crescimento de *Candida*, com mudança do seu estado comensal para um estado patogênico. Na maioria das vezes, essas alterações estão relacionadas a desequilíbrios imunológicos do hospedeiro (WILLIAMS e LEWIS, 2011).

As várias espécies do gênero *Candida* possuem consideráveis variações genotípicas e fenotípicas. O que se sabe hoje sobre a imunidade das infecções causadas por *Candida*, por exemplo, foi obtido quase que exclusivamente por meio de estudos com *C. albicans* (WHIBLEY e GAFFEN, 2015). Embora a *C. albicans* tenha sido a mais isolada das infecções e a mais estudada, a prevalência de espécies não-*albicans* está emergindo, representando uma porção substancial dos isolados clínicos em ambiente hospitalar. As espécies não-*albicans* de maior importância incluem *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (PAPON et al., 2013). Isso mostra a importância de buscar novos compostos que possuam ação de amplo espectro entre as espécies de *Candida*.

Uma vez instalada a infecção por *Candida* faz-se necessária a intervenção com agentes antifúngicos. Os grupos de antifúngicos conhecidos, indicados para o tratamento da candidíase oral, de modo geral possuem uma boa ação terapêutica (WONG et al., 2014). Os antifúngicos usados atualmente para o tratamento da candidíase estão separados em três classes: os azóis, os polienos e as equinocandinas. A maioria das espécies não-*albicans* costumam exibir uma certa resistência primária ou susceptibilidade reduzida a esses antifúngicos (WALKER, GOW e MUNRO, 2013) Isso mostra que o estudo aprofundado dessas espécies e a busca por novas drogas tornam-se necessários. Sabe-se que as espécies de *Candida* podem apresentar diferentes graus de susceptibilidade aos agentes antifúngicos. A *C. krusei*, por exemplo, é intrinsecamente resistente ao fluconazol e *C. glabrata* apresenta uma susceptibilidade dose-dependente reduzida. Já para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* a resistência ao fluconazol é considerada rara (PFALLER et al., 2010).

Assim como mencionado anteriormente para *C. albicans*, todas as outras espécies mencionadas são capazes de formar biofilme. E essa capacidade é um fator de importante para o estabelecimento da doença humana e resistência as drogas (SARDI et al., 2013). A progressão dessa resistência aos antifúngicos está associada ao processo de maturação (SARDI et al., 2011). A resistência aos fármacos pelas diversas espécies de *Candida* têm sido considerada um grave problema de saúde (KABIR e AHMAD, 2012). Os estudos têm mostrado que, além da capacidade de formar biofilme, outros fatores estão relacionados à resistência aos antifúngicos, como: o bombeamento de drogas do interior das células fúngicas,



a modificação dos alvos antifúngicos, a modificação de enzimas-chave para as vias biossintéticas e a modulação dos fatores de transcrição (CANNON et al., 2009; MORSCHHÄUSER, 2010; KABIR e AHMAD, 2012).

## 2.4 Antifúngicos

As classes químicas de antifúngicos que estão disponíveis para o tratamento de infecções decorrentes de *Candida* incluem polienos, análogos de pirimidina, azóis, equinocandinas, alilaminas, tiocarbamatos e morfolinas (SANGLARD et al., 2009). Dentre os mais indicados para o tratamento de candidíase oral, destacam-se os derivados azólicos (fluconazol, miconazol e itraconazol) e os poliênicos (nistatina e anfotericina B) (KURIYAMA et al, 2005).

Embora a resistência aos medicamentos antifúngicos seja considerada menos problemática em *Candida* spp. do que em outros agentes patogênicos, os recentes aumentos na resistência para equinocandinas e azóis resultaram em alguns insucessos no tratamento (ALEXANDER et al, 2013; SHIELDS et al., 2013). Apesar do desenvolvimento de novos antifúngicos, como as equinocandinas, que possuem ação por meio de novos alvos terapêuticos, e antifúngicos de amplo espectro, como alguns novos azóis, o arsenal antifúngico disponível ainda é considerado restrito (MAUBON et al., 2014).

Com relação ao mecanismo de ação dos antifúngicos usados no tratamento da candidíase oral, é possível destacar a ação dos azóis. Durante muito tempo acreditou-se que esses fármacos agissem unicamente na membrana celular, mas, atualmente, sabe-se que eles também atuam na estrutura da parede celular, semelhante ao que ocorre com os agentes de interrupção de parede celular conhecidos (SORGO et al., 2011).

Na classe dos polienos, como a anfotericina B, pode-se destacar a capacidade de se ligar a lípidos e lipossomas derivados do ergosterol, causando a formação de poros e de fuga iônica. Esses acontecimentos desencadeiam a morte celular, o que caracteriza o efeito fungicida desses fármacos. Nos mamíferos, o colesterol é o principal esterol das membranas celulares, diferente dos fungos. Mas apesar do ergosterol e o colesterol terem estruturas diferentes, a especificidade

desses fármacos não é absoluta e tem sido demonstrada a possibilidade de ligação ao colesterol (MAUBON et al., 2014).

Apesar da boa ação terapêutica encontrada nos grupos químicos de antifúngicos mencionados, tais drogas podem apresentar efeitos indesejáveis, onde é possível destacar a toxicidade relacionada com a dose (CHANDRASEKAR, 2011). Essa é a principal limitação para o uso desses agentes e também a principal justificativa para a busca de novas formulações de antifúngicos com atividade terapêutica adequada. Desse modo, um agente antifúngico ideal deve ter toxicidade nula ou reduzida em relação às células humanas (WONG et al., 2014). Assim, uma fonte de busca para essas possíveis propriedades e desenvolvimento de novas drogas pode ser obtida por meio dos produtos naturais de origem vegetal. Dessa forma, muitas plantas com propriedades biológicas e antimicrobianas foram e vem sendo estudadas (GUZMAN-BLANCO et al, 2000; VENGURLEKAR, SHARMA e TRIVEDI, 2012).

#### **2.4 Plantas medicinais: fonte de princípios ativos com atividade biológica**

As plantas medicinais e aromáticas são consideradas recursos naturais importantes no ramo farmacêutico, na perfumaria e cosmética e na obtenção de sabores e fragrâncias diversos (SWAMY e SINNIHAH, 2015). O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é tão antigo quanto a própria humanidade (SILVA e FERNANDES JÚNIOR 2010; PETROVSKA, 2012). Cerca de 80% da população mundial é dependente de medicamentos à base de plantas para o tratamento de suas enfermidades (SWAMY et al., 2012).

Representando mais de 20% do número de espécies conhecidas, o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, com mais de 55 mil espécies descritas (CARVALHO et al., 2007). Apesar disso, os recursos que a fauna deste país oferece ainda são pouco explorados. É necessário maior incentivo às pesquisas com produtos naturais por parte do estado e de empresas, o que agregaria valor científico e econômico às espécies nativas. Isso resultaria em novos produtos no mercado, geração de empregos e aumento da economia do país.

Os produtos naturais sempre tiveram um papel na contribuição da medicina moderna e ainda são muito importantes para descoberta e/ou planejamento de drogas. A busca por novas alternativas terapêuticas na flora, tem resultado na busca de princípios ativos importantes, com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas e até anticancerígenas (SEN e SAMANTA, 2014). Devido ao aumento da resistência microbiana aos fármacos atuais no mercado, as empresas farmacêuticas são motivadas a desenvolver novos produtos. O uso popular das plantas medicinais é considerado um bom direcionamento para a busca de novos caminhos terapêuticos (SILVA e FERNANDES JÚNIOR 2010; SWAMY e SINIAH, 2015) e as plantas constituem um recurso rico renovável para a descoberta de novas moléculas bioativas (SEN e SAMANTA, 2014).

Na área da Odontologia cada vez mais estudos têm relatado a utilização segura de plantas medicinais para o tratamento das afecções bucais. Em geral, são usadas plantas como fonte de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, analgésicas e sedativas (HOTWANI, BALIGA e SHARMA, 2014; SINHA e SINHA, 2015). A maioria das moléculas bioativas encontradas nas plantas e usadas para obter os efeitos anteriormente citados, em geral, são polifenóis, fenóis e glicosídeos fenólicos, alcaloides ou terpenoides (HOTWANI, BALIGA e SHARMA, 2014). Apesar disso, ainda há uma grande quantidade de plantas e moléculas não descobertas que podem ser exploradas para o uso odontológico. Dessa forma, a pesquisa com produtos naturais deve ser encorajada e incentivada a fim de trazer novas alternativas para o tratamento das afecções bucais.

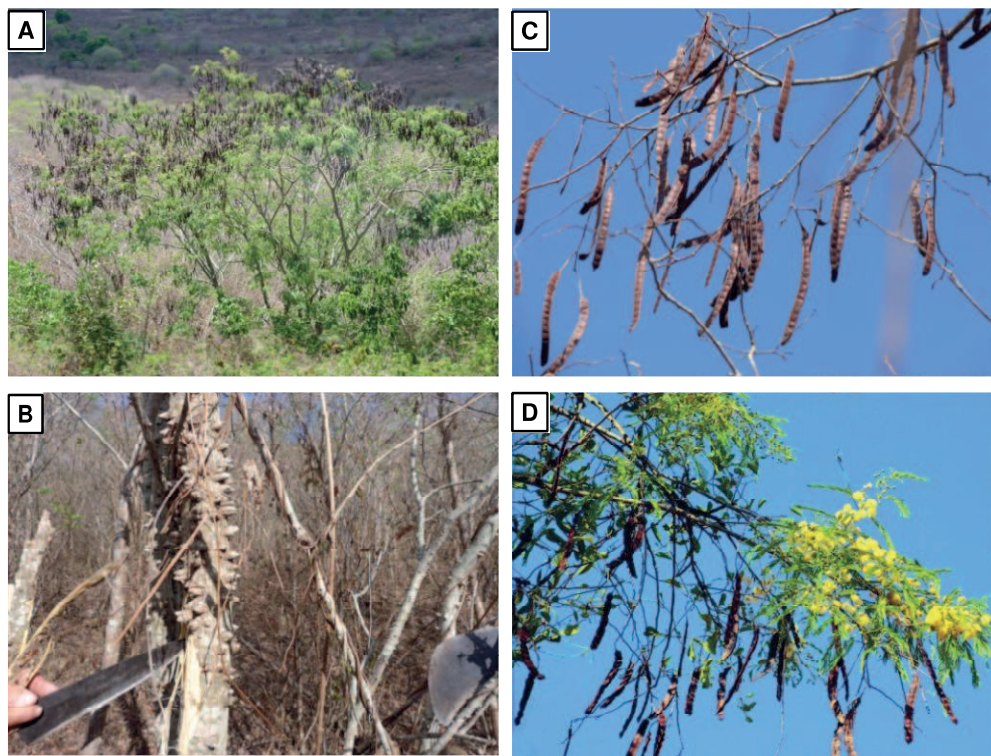
### **2.5 *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan**

*Anadenanthera colubrina* vell. Brenan (*A. colubrina*) constitui uma das plantas utilizadas na medicina popular. É uma espécie arbórea de planta, popularmente conhecida como angico-branco ou angico-liso, pertencente a seção Mimosoideae da família Fabaceae, ordem Fabales (WEBER et al., 2011). No mundo, a espécie ocorre ao sul da linha do Equador, e, no Brasil, desde o Maranhão até São Paulo, passando por Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Trata-se de uma espécie lenhosa típica do bioma Caatinga. É uma planta decídua, heliófita, característica de mata secundária e que pode apresentar até 20 m de altura. Suas flores estão em um tom

que vai do branco ao amarelo. Ela possui flores perfumadas, que estão dispostas em inflorescências terminais (LORENZI, 2002) (Figura 1).

*A. colubrina* é indicada popularmente para o tratamento de inflamações, problemas das vias respiratórias (tosse, gripe e bronquite), diarreia e dor de dente (ALBUQUERQUE ET AL., 2006; SOUSA ARAÚJO, ALENCAR, AMORIM, e ALBUQUERQUE, 2008). É considerada como uma planta de potencial terapêutico, mas ainda pouco explorada do ponto de vista farmacológico.

Em estudo prévio, identificamos forte potencial antifúngico do extrato da casca desta planta, frente à *C. albicans*, com concentração inibitória mínima de 0,31 mg/mL. Verificou-se ainda que esse extrato inibe a formação de biofilme de *C. albicans*, e produz mudanças na morfologia desse microrganismo (LIMA et al., 2014). Esses resultados apontam o extrato da *A colubrina* como uma fonte promissora para o desenvolvimento de formulações antifúngicas para o tratamento da candidíase oral.



**Figura 1.** Visão geral de *A. colubrina* (A), do seu tronco (B), frutos (C) e flores (D). (Imagem 1D - Fonte: Vinícius Lumbambo - [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Angico/anadenantheracolubrinavellbrenan.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Angico/anadenantheracolubrinavellbrenan.html)).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* se o extrato da casca *A. colubrina* possui ação antifúngica e antibiofilme sobre cepas de *Candida* e se é potencialmente seguro para considerar seu uso para o tratamento da candidíase oral.

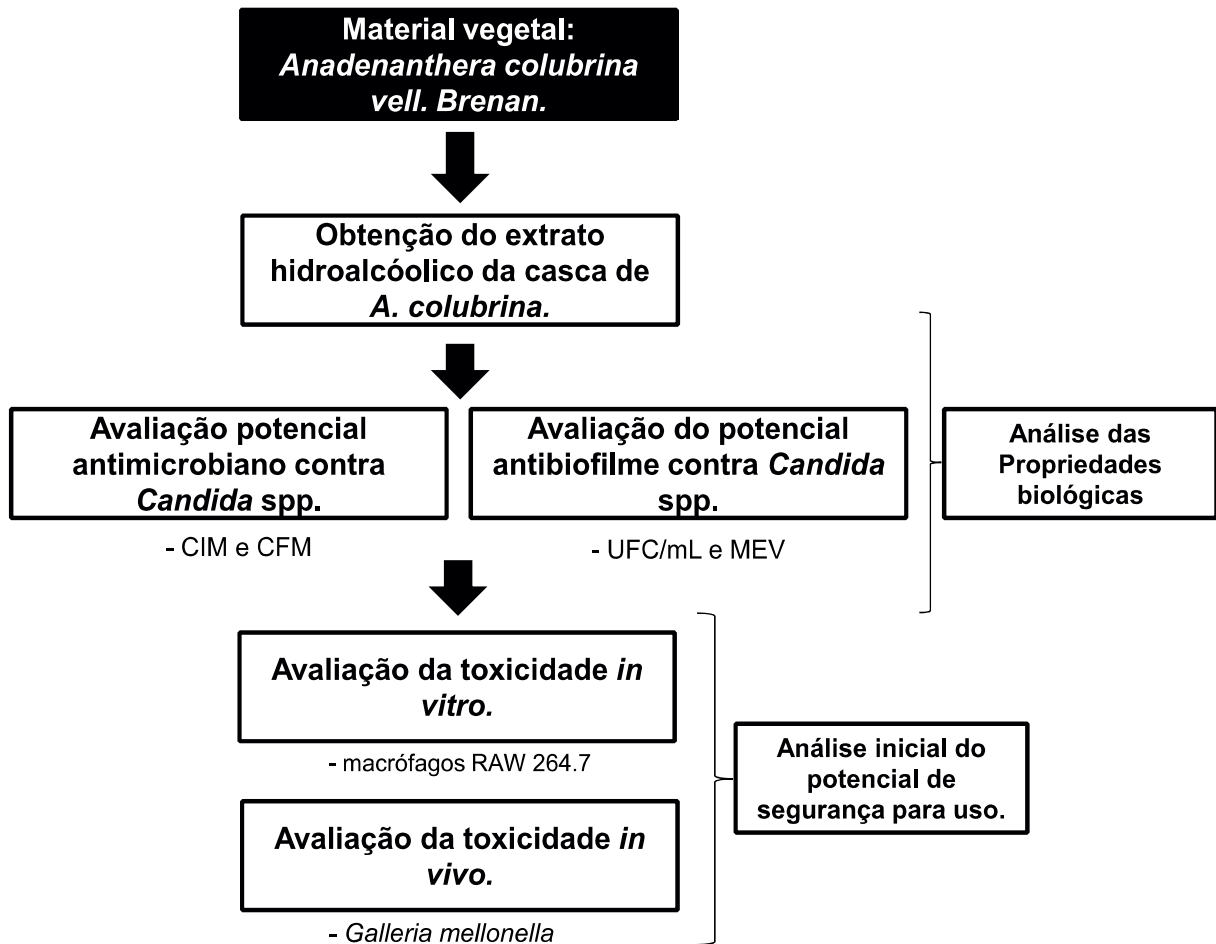
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato de *A. colubrina* sobre diferentes espécies de *Candida*;
- Avaliar se o extrato de *A. colubrina* possui capacidade para reduzir o número de unidades formadoras de colônia em biofilme maduro de *Candida*;
- Identificar a ocorrência de mudanças na morfologia das células do biofilme quando em contato com o extrato, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato de *A. colubrina* para elucidar o potencial de segurança para sua utilização no tratamento da candidíase oral.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO E SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, *in vitro* e *in vivo*, cuja sequência metodológica está representada no fluxograma abaixo:



**Figura 2:** Sequência metodológica do estudo (Detalhamento da metodologia - Apêndice A).

### 4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba e Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), em Piracicaba, São Paulo. Este trabalho integra o projeto realizado em parceria com a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), por meio do Convênio Federal Casadinho/Procad Nº 552561/201108 do CNPq/MCT e Capes/MEC.



## 5. RESULTADOS (ARTIGO)

Os resultados deste trabalho foram organizados em forma de artigo intitulado: Potencial antibiofilme contra espécies de *Candida* e toxicidade *in vitro* e *in vivo* da *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan (angico).

### POTENCIAL ANTIBIOFILME CONTRA ESPÉCIES DE *Candida* E TOXICIDADE *in vitro* E *in vivo* DA *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan (ANGICO)

#### RESUMO

Objetivo: este estudo avaliou o potencial antifúngico e antibiofilme do extrato hidroalcoólico da casca da *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan, conhecida como angico e angico branco. Método: a atividade antifúngica foi inicialmente avaliada pela técnica da microdiluição em caldo com obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). O potencial antibiofilme foi testado em biofilmes maduros formados por espécies de *Candida* e analisados por contagem de UFC/mL e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A toxicidade *in vitro* foi analisada em macrófagos Raw 264.7 e a toxicidade sistêmica foi avaliada *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*. Resultados: observou-se um forte potencial antifúngico do extrato contra cepas do gênero *Candida*, obtendo-se os seguintes valores da CIM: *Candida albicans* ATCC 5314 e ATCC 90028 (19.5 µg/mL), *Candida tropicalis* ATCC 750 (5000 µg/mL), *Candida glabrata* ATCC 90030 (1250 µg/mL), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 (39 µg/mL). O tratamento com o extrato reduziu o número de UFC/mL e foi capaz de causar alteração estrutural no biofilme e destruição celular, observadas em MEV, apresentando uma promossa atividade antibiofilme contra *Candida*. *A. colubrina* apresentou moderada toxicidade *in vitro* em cultura de macrófagos RAW 264.7. No ensaio *in vivo* o extrato não afetou a viabilidade das larvas em doses abaixo de 100 mg/kg, apresentando baixa toxicidade. Conclusão: considerando seu alto potencial antifúngico e sua baixa toxicidade *in vivo*, o extrato de *A. colubrina* é um forte candidato para o desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento da candidíase oral.

#### 1. INTRODUÇÃO

Candidíase é uma infecção fúngica causada por espécies do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* a espécie mais comumente associada. Esta espécie faz parte na microbiota oral, podendo ser isolada em aproximadamente 80% dos indivíduos saudáveis (Shao et al., 2007; Kullberg & Arendrup, 2015). Alterações das condições normais na cavidade oral podem favorecer o crescimento de *Candida* com mudança do seu estado comensal para o patogênico. Na maioria das vezes, essas alterações ambientais estão relacionadas a desequilíbrios imunológicos do hospedeiro (Williams & Lewis, 2011).

A candidíase pode ocorrer como uma condição local (mucocutânea) ou sistêmica, e apresentar-se de uma forma aguda, crônica e em associação com outros tipos de lesões (Patil, Rao, Majumdar, & Anil, 2015). Constitui uma das infecções oportunistas mais ocorrentes em pacientes imunocomprometidos, especialmente com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e acometidos por câncer (Hani et al., 2015), com prevalência de 9 a 31% e 20%, respectivamente. Além disso, ocorre em torno de 5 a 7% das crianças nos primeiros anos de vida e é bastante frequente em usuários de prótese dentária total (Lalla et al., 2013; Pereira et al., 2016).

Em relação ao tratamento da candidíase oral, é possível destacar fármacos como os derivados azólicos (fluconazol, miconazol e itraconazol) e o poliênico (nistatina) que apesar da boa ação terapêutica, os mesmos podem apresentar efeitos indesejáveis e, principalmente, toxicidade relacionada com a dose (Kuriyama et al., 2005; Garcia-Cuesta, Sarrion-Perez, & Bagan, 2014). Essa é a principal limitação para o uso desses agentes e também a principal justificativa para a busca de novas formulações de antifúngicos com atividade terapêutica adequada. Desse modo, um agente antifúngico ideal deve ter toxicidade nula ou reduzida em relação às células humanas (Wong, Samaranayake, & Seneviratne, 2014). Nessa perspectiva, busca-se uma fonte de compostos ativos a partir de plantas medicinais, com potencial para o desenvolvimento de novas e eficazes formas farmacêuticas.

*Anadenanthera colubrina* vell Brenan (*A. colubrina*), popularmente conhecida como angico, representa uma das plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de inflamações, problemas das vias respiratórias (tosse, gripe e bronquite), diarreia e dor de dente (Albuquerque et al., 2006; de Sousa Araújo et al., 2008). É considerada como uma planta de potencial terapêutico, mas ainda pouco explorada do ponto de vista farmacológico. Pertence a seção Mimosoideae da família Fabaceae, ordem Fabales (Weber et al., 2011). No mundo, a espécie ocorre ao sul da linha do Equador, e, no Brasil, desde o Maranhão até São Paulo, passando por Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Trata-se de uma espécie lenhosa típica do bioma Caatinga (Lorenzi, 2002).

Estudos recentes demonstraram que a *A. colubrina* possui propriedades terapêuticas promissoras, como atividade antifúngica (Campos et al., 2014; Lima et



al., 2014; Nunes et al., 2015) e anti-inflamatória e antinociceptiva sendo as duas últimas comprovadas em modelo animal (Santos et al., 2013).

Em um estudo prévio, nosso grupo verificou que a *A. colubrina* possui um forte potencial antifúngico, frente à *C. albicans*, inibindo a formação de biofilme com alterações em sua morfologia (Lima et al., 2014). Esses resultados sinalizaram esta planta como uma possível fonte de princípios ativos para o desenvolvimento de formulações antifúngicas para o tratamento da candidíase oral. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a ação antifúngica e antibiofilme *in vitro* do extrato de *A. colubrina* estende-se para diferentes espécies do gênero *Candida*, assim como avaliar em modelo *in vivo* e *in vitro* se o seu nível de toxicidade é baixo o suficiente para considerar o seu uso no tratamento da candidíase oral.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção do material vegetal e preparação do extrato**

As cascas da *A. colubrina* foram coletadas no mês de setembro, em região de semiárido, na cidade de Queimadas/Paraíba (7° 22' 25"S, 35° 59' 32" W). Autorização de acesso ao patrimônio genético para pesquisa científica/CNPq, processo nº: 010682/2015-5. Uma exsicata foi depositada no herbário Manuel de Arruda Câmara da Universidade Estadual de Paraíba (Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil), sob nº 667/ ACAM. As cascas foram secas, moídas e imersas em etanol a 80% (100g/250mL) à temperatura ambiente durante 48 horas. A mistura resultante foi filtrada e os resíduos foram imersos em 80% de álcool etílico duas vezes adicionais. As três fases líquidas finais foram concentradas em evaporador a vácuo e liofilizadas.

### **2.2 Teste de susceptibilidade dos microrganismos**

A susceptibilidade microbiana foi analisada por meio da técnica da microdiluição em caldo, em que foram incluídos os seguintes microrganismos: *Candida albicans* ATCC 5314, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258. Foram usadas também duas cepas de *Candida albicans* isolados frescos de lesões de candidíase oral de pacientes da clínica-escola da Universidade Estadual da Paraíba, sob aprovação do comitê de ética desta

instituição, em 15 de dezembro de 2015, com o número: 51779315.7.0000.5187. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) seguiu as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). O teste foi realizado em microplacas de 96 poços contendo 100 µL/poço de meio de cultura específico para leveduras RPMI 1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, Nova Iorque, EUA). O extrato foi diluído em DMSO 20%, distribuído nos poços da microplaca, por meio de diluições seriadas obtendo concentrações de 5000 e 4.882 µg/mL. A nistatina (Sigma-Aldrich) foi usada como controle positivo. Foi considerado um inóculo de  $5 \times 10^3$  células/mL, que no poço caiu para  $2.5 \times 10^3$  células/mL padronizado em câmara de Neubauer. As placas foram incubadas a 27°C, por 24 horas. A CIM foi definida por método visual inicialmente considerando a mudança da cor do meio de cultura do rosa para o amarelo. Em seguida, adicionou-se 30 µL de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 0,01% nos poços. Para a determinação da CFM, uma alíquota (50 µL) de cada poço com as concentrações igual e maiores do que a CIM foi semeada em meio ágar Sabouraud dextrose, incubadas 37°C, por 24 horas.

### 2.3 Análise da atividade antifúngica

Inicialmente, foi induzida a formação de biofilme de *Candida* em microplacas de 96 poços. Foram distribuídos, em cada poço, 100µL do inóculo (entre  $10^7$  e  $10^8$  células/mL) em meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) (Sigma-Aldrich) suplementado com glicose, com incubação a 37° C por 24 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o biofilme lavado 3 vezes com solução de NaCl 0.9%. Foi adicionado o tratamento com o extrato de *A. colubrina* em concentrações baseadas na CIM de cada cepa: *C. albicans* (100 vezes a CIM - 1950 µg/mL e 500 vezes a CIM - 9750 µg/mL), *C. tropicalis* (10 vezes a CIM - 50000 µg/mL), *C. glabrata* (10 vezes a CIM - 12500 µg/mL), *C. parapsilosis* (100 vezes a CIM - 3900 µg/mL e 500 vezes a CIM - 19500 µg/mL) e *C. krusei* (100 vezes a CIM - 3900 µg/mL e 500 vezes - 19500 µg/mL). O extrato foi diluído inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) 20 % e em seguida em meio de cultura RPMI 1640 para chegar às concentrações usadas nos testes. A nistatina numa concentração de 100 vezes a CIM para cada cepa foi usada como controle positivo. O biofilme foi tratado por 24 horas, a 37° C. Em seguida, foi removido e diluído até 10 vezes em solução de NaCl 0,9%. As últimas 5 diluições foram semeadas em placa de Petri, contendo

meio de cultura ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37° C por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

#### **2.4 Cultura celular e ensaio de viabilidade celular**

As células macrófagos RAW 264.7 foram obtidas no banco de células do Rio de Janeiro (ATCC, Rio de Janeiro, Brasil) e cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, 10 U/mL de penicilina, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina e L-glutamina (37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%). Com o objetivo de determinar os efeitos do extrato sobre a viabilidade celular, foi utilizado o método de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10<sup>6</sup> células/mL/poço) e incubadas por 24 h nas condições previamente descritas. As células foram tratadas com extrato de *A. colubrina* nas concentrações de 100, 390, 780, 1560, 3120, 6250, 12500 e 50000 µg/mL por 24 h. O grupo controle negativo recebeu DMSO a 1% e o grupo controle positivo recebeu nistatina nas concentrações de 0,5, 1, 50, 100 e 500 µg/mL por 24 h. Foi utilizado um grupo para controle interno tratado com meio de cultura (M). Após esse período, foram adicionados 200 µL de uma solução de MTT (0,3 mg/mL) em cada poço e as placas incubadas por 3 horas, sob as mesmas condições. O sobrenadante foi removido e adicionado 200 µL de DMSO 100% para lise das células. A absorbância foi medida a 470 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA (DENIZOT e LANG, 1986).

#### **2.5 Toxicidade sistêmica *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella***

A toxicidade aguda sistêmica do extrato de *A. colubrina* foi avaliada *in vivo*, utilizando o modelo de larvas *Galleria mellonella*, com modificações anteriormente descritas (Megaw et al., 2015; Rochelle et al., 2016). Doses crescentes do extrato (de 50 mg/kg a 10 g/kg) foram testadas a fim de determinar a sua DL 50 (dose mínima capaz de matar 50% das larvas ao longo do tempo). Foram selecionadas aleatoriamente 10 larvas, sem sinais de melanização e pesando entre 0,2 e 0,3 g, para cada grupo. Foram injetados 5 µL do extrato nos grupos teste e 5 µL do solvente (DMSO 20%) no grupo controle. A injeção foi feita na hemocele de cada larva, por meio da última pró-pata esquerda, utilizando uma seringa Hamilton 25 µL (Hamilton, Reno, NV). As larvas foram incubadas a 30°C e a sua sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados (a cada 9 horas) até 48 horas. As larvas que

não apresentaram movimentos ao toque dorsal e que apresentaram melanização foram contadas como mortas (Rochelle et al., 2016).

## 2.6 Análise da morfologia celular

Os biofilmes de *C. albicans* 5314 e *C. albicans* 90028 foram formados em lâminas (Lab-Tek, Nunc, Naperville, IL, EUA), utilizando o método descrito no item 2.3 e tratados com o extrato nas concentrações 1.95 mg/mL (100 vezes a CIM) e 9.75 mg/mL (500 vezes a CIM), por 24 horas. As células foram fixadas em glutaraldeído a 3% em uma solução tampão de fosfato à temperatura ambiente, durante 12 horas. O biofilme foi, então, desidratado em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 90 e 100%), metalizado com ouro e examinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SEM; JEOL JSM 5600LV, JEOL Tóquio, Japão).

## 2.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto a sua distribuição, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, utilizou-se a análise de variância (ANOVA one-way) e análise post-hoc pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5% ( $\alpha < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

O extrato de *A. colubrina* inibiu o crescimento de todas as espécies de *Candida* testadas, em concentrações a partir de 19,5 µg/mL (tabela 1). As análises sobre as cepas *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* apresentaram os maiores valores de CIM.

**Tabela 1.** Distribuição dos valores das concentrações inibitória mínima e fungicida mínima do extrato da *A. colubrina*, de acordo com a espécie de *Candida*.

Microrganismos	CIM µg/mL	CFM µg/mL	CFM/CIM	CIM Nistatina µg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC 5314	19.5	625	32	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	19.5	625	32	1
<i>Candida albicans</i> (cepa clínica 01)	19.5	>500	*	3
<i>Candida albicans</i> (cepa clínica 02)	39	>500	*	3

<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	5000	>5000	*	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	1250	>1250	*	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	39	79	2	1
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	39	39	1	1

Fungicida (CFM/CIM < 4) ou fungistático (CFM/CIM  $\geq$  4), (Siddiqui et al., 2013).

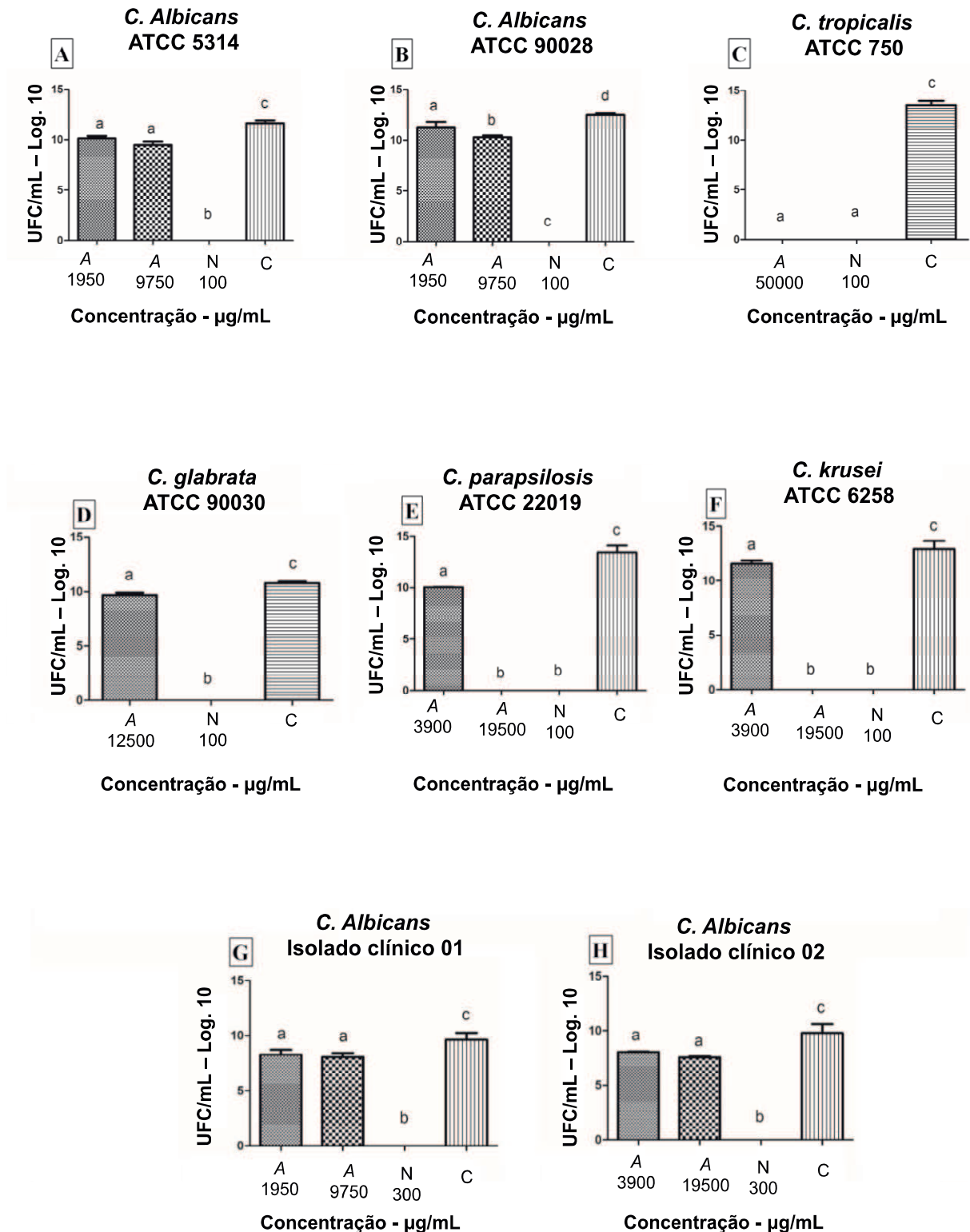
\* Não foi possível determinar a razão MFC/CIM.

O extrato de *A. colubrina* apresentou atividade sobre biofilme formado por espécies de *Candida*. Os melhores resultados foram observados nas espécies *C. tropicalis* (biofilme tratado com o extrato na concentração 10 vezes a CIM, 50000  $\mu\text{g/mL}$ ) e para as *C. parapsilosis* e *C. krusei* (biofilme tratado com o extrato na concentração 500 vezes a CIM, 19500  $\mu\text{g/mL}$ ). Apenas nessas concentrações e para essas espécies, o extrato apresentou atividade antifúngica semelhante à nistatina. Porém, os biofilmes de todas as espécies sofreram alteração e diminuição do número de UFC/mL quando tratado com extrato de *A. colubrina* (figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G e 1H). As figuras 1G e 1H mostram a atividade antibiofilme de *A. colubrina* frente a isolados clínicos frescos de *C. albicans*. Os resultados mostram que o biofilme foi afetado, mas que não houve diferença entre as concentrações 100 e 500 vezes a CIM.

A MEV mostra a diferença na integridade do biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 com e sem tratamento com extrato de *A. colubrina*. O biofilme tratado com *A. colubrina* sofreu alteração estrutural significativa. É possível observar uma destruição celular mais acentuada causada pela ação do extrato na concentração 500 vezes a CIM (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D).

A fim de verificar a citotoxicidade do extrato de *A. colubrina*, nistatina e do veículo DMSO, realizou-se o ensaio de viabilidade celular (RAW 264.7) por 24 h. O extrato de *A. colubrina* não apresentou toxicidade celular (viabilidade acima de 80%) nas concentrações de 100 a 780  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3A) quando comparado ao grupo controle meio de cultura ( $p > 0,05$ ). Entretanto, as células que receberam o extrato de *A. colubrina* nas concentrações de 1560 a 50000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3A) apresentaram redução em torno de 40% da viabilidade quando comparadas ao grupo controle meio de cultura ( $p < 0,05$ ). As células que receberam o tratamento com DMSO na concentração de 1% (Figura 3A) não apresentaram diminuição na viabilidade celular (viabilidade acima de 80%) quando comparado com grupo controle meio de cultura

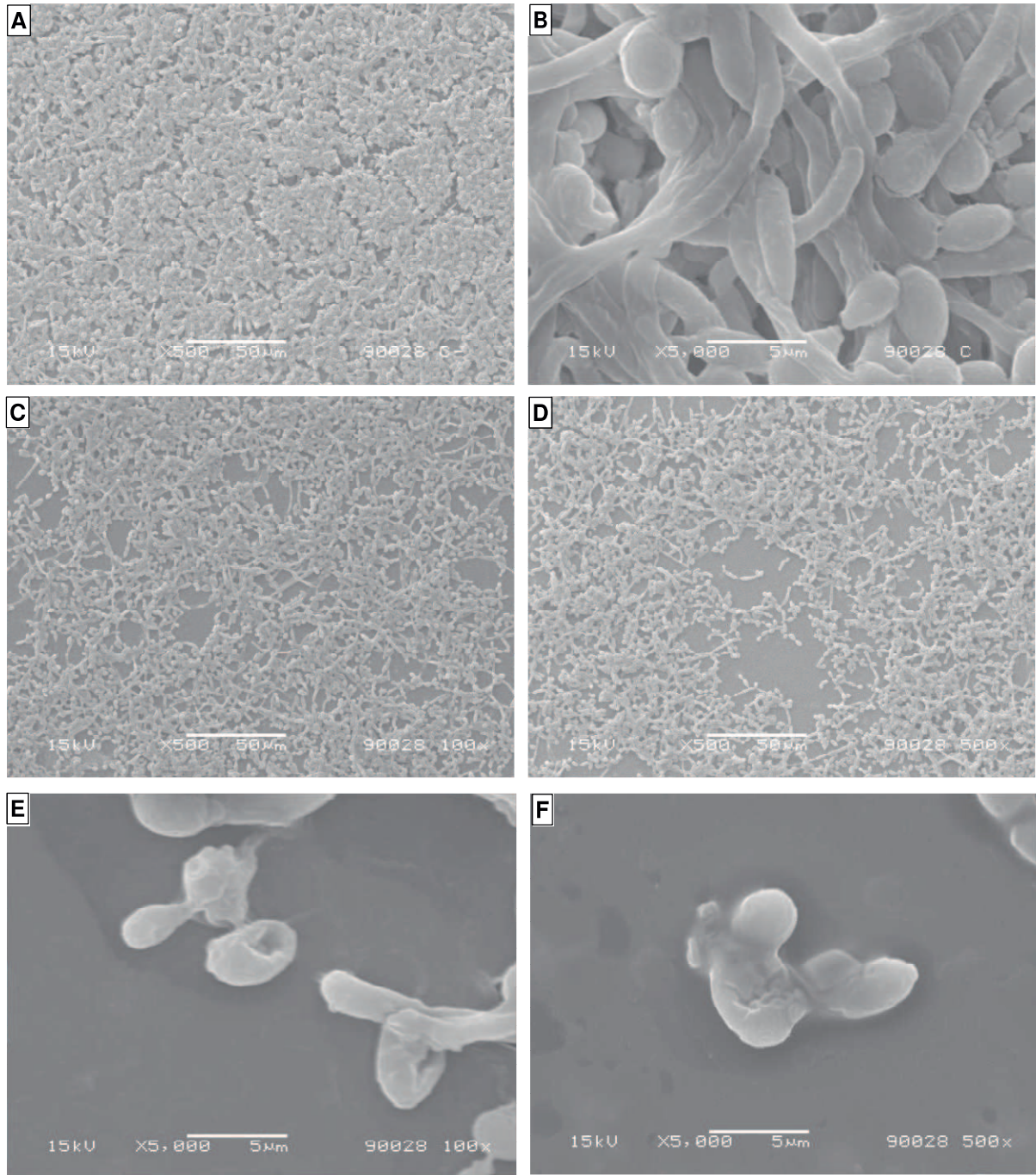
( $p > 0,05$ ). As células que receberam o tratamento com nistatina nas concentrações de 0,5, 1, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 3B) não apresentaram redução em sua viabilidade quando comparado ao grupo controle meio de cultura ( $p > 0,05$ ), entretanto, a concentração 500  $\mu\text{g/mL}$  apresentou toxicidade comparado ao grupo controle meio de cultura ( $p < 0,05$ ).





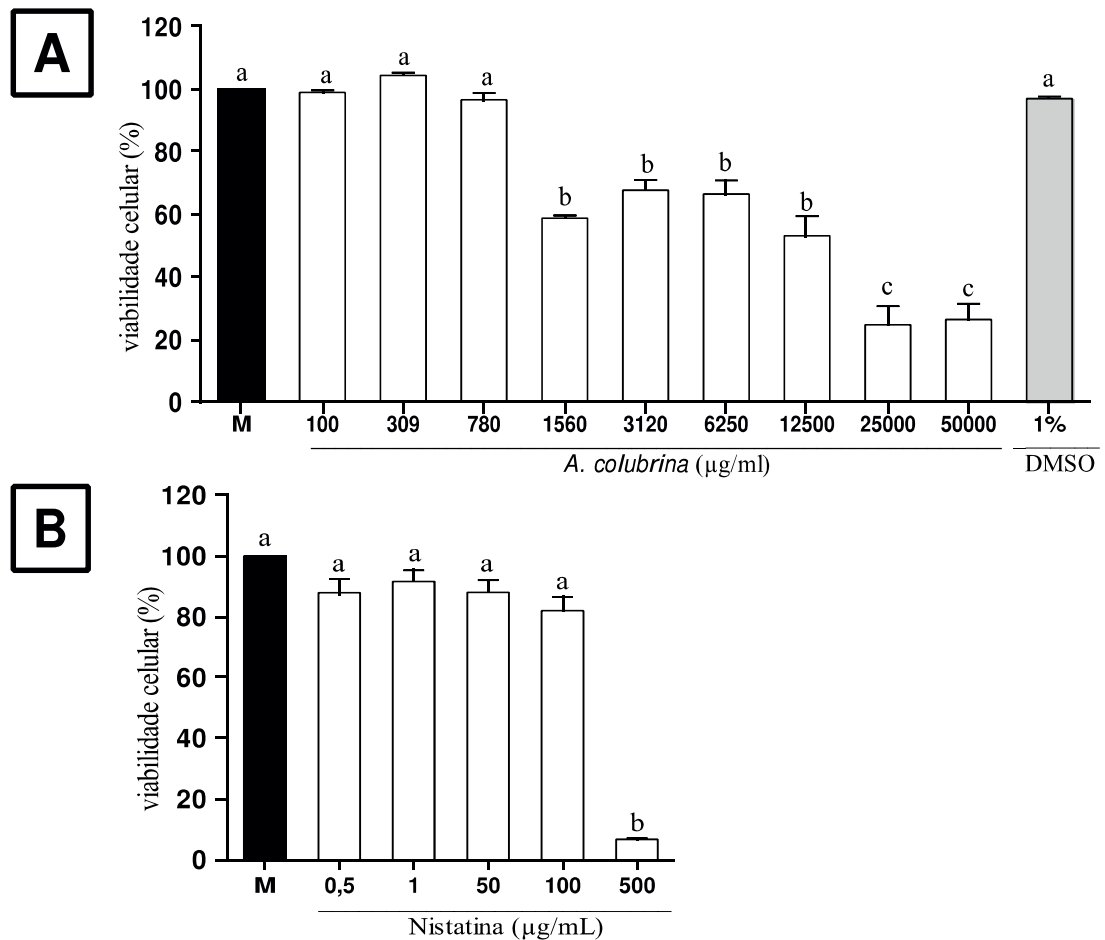
**Figura 1.** Atividade antibiofilme do extrato de *A. colubrina*: Efeito de *A. colubrina* (**A**) nas concentrações de 1950 µg/mL (100 vezes a CIM) e 9750 µg/mL (500 vezes a CIM) sobre *C. albicans* ATCC 5314 (**Figura 1A**) e *C. albicans* 90028 (**Figura 1B**), na concentração de 50000 µg/mL (10 vezes a CIM) sobre *C. tropicalis* ATCC 750

(**Figura 1C**), na concentração de 12500 µg/mL (10 vezes a CIM) sobre *C. glabrata* ATCC 90030 (**Figura 1D**), na concentração de 3900 µg/mL (100 vezes a CIM) e 19500 µg/mL (500 vezes a CIM) sobre a *C. parapsilosis* 22019 (**Figura 1E**) e a *C. krusei* ATCC 6258 (**Figura 1F**). Os isolados clínicos frescos de *C. albicans* foram tratados com *A. colubrina* na concentração de 1950 µg/mL (100 vezes a CIM) e 9750 µg/mL (500 vezes a CIM) para o isolado clínico 01 (**Figura 1G**) e na concentração de 3900 µg/mL (100 vezes a CIM) e 19500 µg/mL (500 vezes a CIM) para o isolado clínico 02 (**Figura 1H**). Controle negativo (**C**) e a nistatina (**N**) (100 vezes a CIM encontrada para cada cepa).



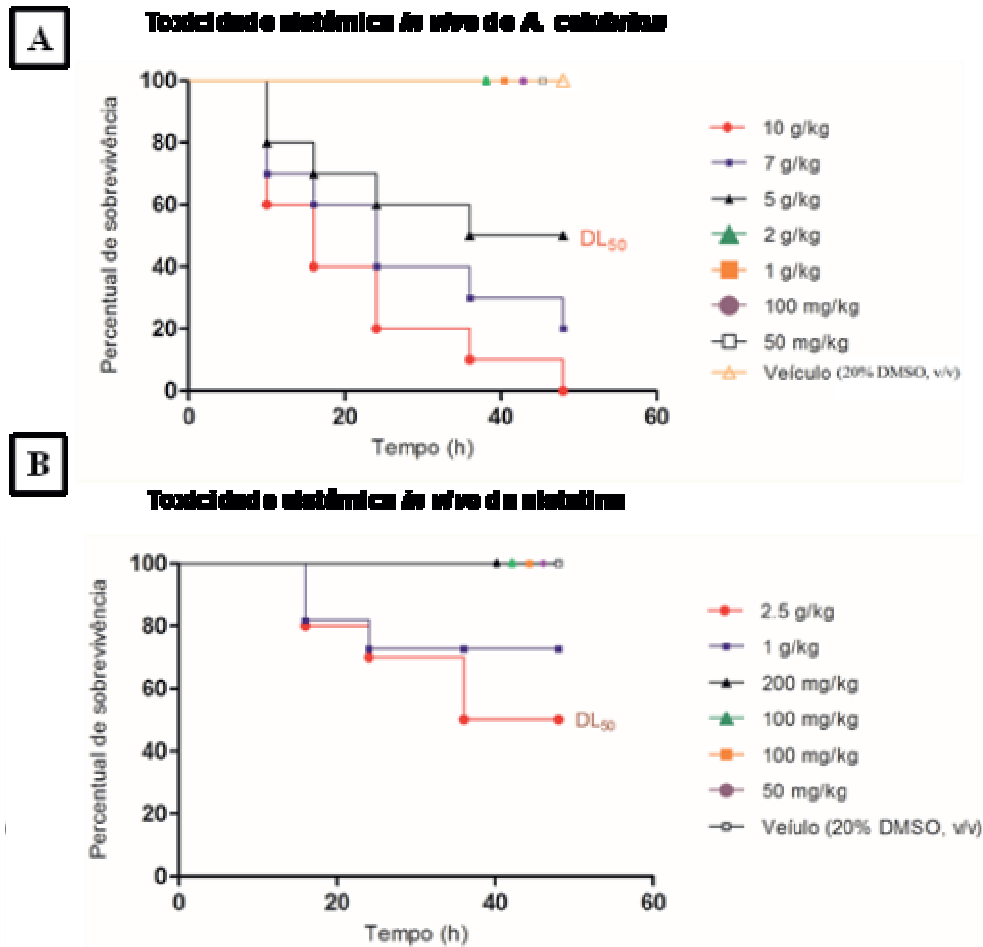
**Figura 02.** Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028, mostrando a morfologia celular. Controle negativo, aumento 500x (**Figura 2A**) e 5000x (**Figura 2B**), evidenciando a morfologia normal das leveduras e hifas. Biofilme tratado com *A. colubrina* 1950 µg/mL (100 vezes a CIM) (**Figura 2C: 500x; Figura 2E: 5000x**) e 9750 µg/mL (500 vezes a CIM) (**Figura 2D, 500x; Figura 2F: 5000x**) mostrando a desintegração do biofilme e destruição celular.





**Figura 3.** Porcentagem da viabilidade celular (RAW 264.7) quando tratadas com extrato de *A. colubrina* (Figura 3A) e nistatina (Figura 3B). Os dados do grupo controle meio de cultura (M) foram normalizados para 100% e utilizados como controle negativo. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação ao potencial de toxicidade do extrato de *A. colubrina*, em modelo de *Galleria mellonella*, observou-se baixa toxicidade aguda sistêmica. Nas doses terapêuticas antimicrobianas, o extrato não afetou a sobrevivência das larvas até o período de 72h ( $P > 0.05$ ). Apenas em altas doses, como 10 g/kg e 5 g/kg, foi verificada a morte das larvas na faixa de 90% e 70%, respectivamente, ao fim do experimento ( $P < 0.0001$ ). O veículo utilizado para solubilizar o extrato (DMSO 20%), assim como doses do extrato abaixo de 100 mg/kg, não afetaram a viabilidade das larvas ( $P > 0.05$ ) (figura 7). A nistatina apresentou toxicidade a partir de 1 g/kg. A concentração de nistatina necessária para matar 50% das larvas ( $DL_{50}$ ) foi 2.5 g/kg (Figura 8).



**Figura 4.** Toxicidade sistêmica *in vivo*, em *Galleria mellonella*, do extrato de *A. colubrina* e da nistatina. Para *A. colubrina* foram usadas doses crescentes de 50 mg/kg a 10 g/kg (**Figura 4A**) e para a nistatina de 5 mg/kg a 2.5 g/kg (**Figura 4B**).

#### 4. DISCUSSÃO

Apesar de existirem muitas drogas eficazes contra *Candida*, o seu uso tem se tornado limitado (Liu et al., 2016). Os agentes antifúngicos em geral, mais usados atualmente, estão se tornando ineficazes devido o desenvolvimento de resistência, toxicidade do hospedeiro e efeitos colaterais indesejáveis (Campoy e Adrio, 2016). É considerada urgente a necessidade de novas drogas antifúngicas com baixa toxicidade contra infecções oportunistas, como a candidíase oral (Liu et al., 2016).

*A. colubrina* foi sinalizada anteriormente como uma planta com forte capacidade de inibição de crescimento para a espécie *C. albicans* (Lima et al., 2014; Nunes et al., 2015). Mostramos aqui que essa capacidade de inibição de

crescimento estende-se também para outras espécies de *Candida* não-*albicans*, como a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Encontramos valores de CIM para *C. albicans*, que diferem dos encontrados anteriormente (Lima et al., 2014; Nunes et al., 2015) sendo os nossos resultados atuais mais positivos. Esta diferença pode estar relacionada com o uso de cepas diferentes entre os estudos. Outro fator que pode ter influenciado nesta diferença é o veículo de diluição do extrato. Os estudos anteriores utilizaram álcool 40% e neste estudo usamos DMSO 20%. É possível que DMSO possa ter solubilizado melhor os componentes do extrato, potencializando sua ação.

A capacidade das espécies de *Candida* se desenvolverem na forma de biofilme reflete em consequências clínicas, pelo fato desses microrganismos mostrarem certa resistência a terapia antifúngica em doses terapêuticas usuais. Dessa forma, a formação de biofilme é considerada um dos principais fatores de virulência associada a *C. albicans*, o que contribui para o aumento da mortalidade em pacientes imunocomprometidos com candidíase (Mayer, Wilson, & Hube, 2013; Uppuluri, Pierce, & López-ribo, 2009). Nossos resultados mostraram que *A. colubrina* em concentrações superiores a CIM é capaz de afetar o biofilme de todas as espécies de *Candida*. A *C. albicans*, considerada a espécie mais presente na cavidade oral dos humanos (Shao et al., 2007; Sellam & Whiteway, 2016), foi a mais sensível na forma planctônica e a menos sensível na forma de biofilme. De fato, *C. albicans* é relatada como formadora de biofilmes quantitativamente maiores e qualitativamente mais complexos do que outras espécies de *Candida* (Kuhn, Chandra, Mukherjee, & Ghannoum, 2002). Apesar da menor sensibilidade em relação as demais espécies, houve redução significativa no número de UFC/mL no biofilme de *C. albicans* tratado com *A. colubrina*.

Embora a *C. albicans* seja descrita como a principal espécie de *Candida* causadora de candidíase, as espécies não-*albicans* demonstram fatores de virulência a priori atribuídos à *C. albicans*, refletindo no aumento de sua resistência aos antifúngicos (Deorukhkar, Saini, & Mathew, 2014). Além disso, espécies de *Candida* não-*albicans* são relatadas cada vez mais em casos de fungemia (Oberoi et al., 2012). Desse modo, a descoberta de novos antifúngicos com ação também sobre espécies de *Candida* não-*albicans* se faz necessária. O extrato de *A. colubrina*

mostrou uma promissora capacidade de alteração do biofilme de espécies não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*). Embora para a *Candida tropicalis*, espécie menos sensível ao extrato, a CIM tenha sido relativamente alta (5000 µg/mL), ele foi capaz de zerar a contagem de UFC/mL do biofilme dessa espécie tratado numa concentração dez vezes a CIM (50000 µg/mL). Apesar de ser uma concentração alta, ainda está aquém da concentração que se mostrou tóxica no modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*.

Estudos *in vitro* como este possuem a limitação de não refletir exatamente as condições do ambiente bucal como elas ocorrem, como a presença de saliva, o componente imunológico do hospedeiro e biofilmes multiespécies com diferentes espécies de *Candida* e bactérias. Entretanto, o extrato de *A. colubrina* foi capaz de alterar a integridade dos biofilmes, diminuindo significativamente o número de UFC/mL em todas as concentrações testadas para os biofilmes das espécies de *Candida* analisadas neste estudo. Este dado mostra que o extrato tem uma notável atividade antibiofilme *in vitro*, sobre biofilme formado por espécies do gênero *Candida*. Existem evidências de que grande parte das condições resultantes de infecções por fungos estão associadas a sua capacidade de formar biofilme (Ramage & López-Ribot, 2005).

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o biofilme formado por *C. albicans* é afetado após o tratamento com *A. colubrina*. Visualmente, há pouca diferença em relação às duas concentrações testadas (100 e 500 vezes a CIM). Este dado é semelhante ao encontrado na contagem de UFC/mL desta mesma cepa, onde a diferença entre as duas concentrações é discreta. Entretanto, em relação ao controle, observa-se significativa alteração do biofilme quando tratado com o extrato de *A. colubrina*.

A fim de verificar o potencial citotóxico do extrato de *A. colubrina*, nistatina e do veículo DMSO em células RAW 264.7, conduziu-se o ensaio de MTT (Figuras 9A e B). Esse ensaio se baseia na absorção do sal MTT pela mitocôndria das células, que reduz esse substrato em um produto colorido chamado formazana. Dessa forma, a intensidade da coloração produzida é diretamente proporcional com a viabilidade celular (MOSMANN,1983). Os resultados encontrados indicaram que o extrato não afetou a viabilidade celular nas concentrações que inibiram o

crescimento de *Candida* em sua forma planctônica. Além disso, houve diminuição da viabilidade celular em torno de 40% a partir da concentração de 1560 µg/mL do extrato de *A. colubrina*, utilizada para os tratamentos dos biofilmes. Apesar da citotoxicidade moderada do extrato em algumas concentrações, o MTT apresenta limitações por ser um método *in vitro* e indireto.

Os dados do modelo *in vivo* de toxicidade em *Galleria mellonella* sugerem que *A. colubrina* apresenta um bom índice de segurança. Apenas doses elevadas do extrato de *A. colubrina* (5 e 10 g/kg) afetaram a viabilidade das larvas e a maior concentração necessária para inibir a espécie de *Candida*, na forma planctônica, menos sensível ao extrato (*Candida tropicalis*) foi de 5 mg/mL. Apesar da simplicidade do organismo, a *Galleria mellonella* têm se tornado um método bastante usado para avaliação primária da toxicidade de substâncias, eficácia de drogas e virulência de microrganismos (Freires et al., 2016). Dessa forma, considerando um possível uso tópico do extrato e sua baixa toxicidade neste modelo *in vivo*, esses dados suportam a ideia de que o extrato de *A. colubrina* possivelmente tem um alto potencial de segurança. É perceptível que o extrato bruto desta planta apresenta um potencial terapêutico promissor. Porém, ele ainda é pouco explorado do ponto de vista farmacológico. Questões como mecanismo de ação, posologia e indicações terapêuticas ainda precisam ser melhor estudadas (Weber et al., 2011).

Com base nos achados do ensaio de toxicidade *in vivo*, as concentrações testadas nos ensaios de biofilme foram extrapoladas para valores de 100 e 500 vezes a CIM. Para as espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata*, foi testada a concentração de 10 vezes a CIM, visto que os valores 100 e 500 vezes a CIM destas cepas ultrapassariam a margem de segurança encontrada no teste de toxicidade, sendo desfavoráveis para um possível uso terapêutico. Este é o primeiro estudo que mostra o potencial de toxicidade sistêmica *in vivo* e *in vitro* do extrato da *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan e sua atividade antifúngica e antibiofilme sobre diferentes espécies de *Candida*.

A etnofarmacologia menciona o potencial terapêutico da *A. colubrina* e o seu uso pela população para o tratamento de condições que afetam a saúde, como inflamações, bronquite, gripe, tosse, diarreia e dor de dente (Albuquerque et al.,

2006; Araújo et al., 2008). Considerando os resultados da citotoxicidade, possivelmente existe uma larga margem de segurança para a utilização terapêutica deste extrato, especialmente, em relação a candidíase oral, uma vez que, a maioria dos casos de candidíase oral são resolvidos com aplicação tópica de antifúngicos (Garcia-Cuesta et al., 2014).

Considerando o alto potencial anti-*Candida* e baixo potencial de toxicidade do extrato de *A. colubrina*, nossos achados estimulam a realização de estudos futuros, mais aprofundados, para confirmação da hipótese de que o extrato apresenta eficácia no tratamento de candidíase e larga margem de segurança. A elucidação da segurança e do potencial terapêutico desta planta agregará valor científico, assegurando seu uso de forma eficaz e segura para o tratamento da candidíase oral.

## **5. CONCLUSÃO**

O extrato de *A. colubrina* apresenta forte atividade antifúngica e antibiofilme contra várias espécies do gênero *Candida*, capaz de afetar a integridade dos mesmos, além de baixa toxicidade. Esses resultados promissores apresentam o extrato bruto de *A. colubrina* como um forte candidato para o desenvolvimento de um medicamento, a partir de seus compostos, para o tratamento da candidíase oral.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque, U. P., Lucena, R. F. P., Monteiro, J. M., Florentino, A. T. N., & Almeida, C. D. F. C. B. R. (2006). Evaluating Two Quantitative Ethnobotanical Techniques. *Acta Botanica Brasilica*, 4, 51–60. Retrieved from <http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/237>
- Araújo, T. A., Alencar, N. L., Amorim, E. L. C., & de Albuquerque, U. P. (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.032>
- Campos, V. A., Perina, F. J., Alves, E., Sartorelli, J., Moura, A. M., & Oliveira, D. F. (2014). *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. *Pest Management Science*, 70, 1815–1822. <https://doi.org/10.1002/ps.3722>
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2016). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986 May 22;89(2):271-7.
- Deorukhkar, S. C., Saini, S., & Mathew, S. (2014). Non-albicans Candida Infection: An Emerging Threat. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 615958. <https://doi.org/10.1155/2014/615958>
- Freires, I. A., Sardi, J. de C. O., de Castro, R. D., & Rosalen, P. L. (2016). Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>
- Garcia-Cuesta, C., Sarrion-Perez, M. G., & Bagan, J. V. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 6, e576-82. <https://doi.org/10.4317/jced.51798>
- Hani, U., Shivakumar, H. G., Vaghela, R., Osmani, R. A. M., & Shrivastava, A. (2015). Candidiasis: A fungal infection- current challenges and progress in prevention and treatment. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 15, 42–52. <https://doi.org/10.2174/1871526515666150320162036>
- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. a. (2002). Comparison of Bio Ims Formed by. *Society*, 70, 878–888. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.878>
- Kullberg, B. J., Arendrup, M. C. (2015) Invasives candidiasis. *N Engl J Med*, 373, 1445-1456. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1315399>.
- Kuriyama, T., Williams, D. W., Bagg, J., Coulter, W. A., Ready, D., & Lewis, M. A. O. (2005). In vitro susceptibility of oral Candida to seven antifungal agents. *Oral Microbiology and Immunology*, 20, 349–353. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00236.x>



- Lalla, R. V., Patton, L. L & Dongari-Bagtzoglou, A. (2013). Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *Journal of the California Dental Association*, 41, 263-268, 2013
- Lima, R. D. F., Alves, É. P., Rosalen, P. L., Ruiz, A. L. T. G., Teixeira Duarte, M. C., Góes, V. F. F., Costa, E. M. M. B. (2014). Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2014/802696>
- Liu, X., Wang, D., Yu, C., Li, T., Liu, J., & Sun, S. (2016). Potential Antifungal Targets against a *Candida* Biofilm Based on an Enzyme in the Arachidonic Acid Cascade—A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01925>
- Lorenzi, H. (2002). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. (4th ed.). Nova Odessa: Instituto Plantarium (Chapter 4)
- Nunes, L. E., Viana, A. P. P., Rocha, W. R. V., Cinha, V. D. S., Catão, R. M. R., Costa, E. M. M. B. (2015). In vitro evaluation of antifungal activity and interactive effect of *Anadenanthera colubrina* (Benth). *African Journal of Microbiology Research*, 9, 2006–2012. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7505>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4, 119–28. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Megaw, J., Thompson, T. P., Lafferty, R. A., & Gilmore, B. F. (2015). *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere*, 139, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.026>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Oberoi, J. K., Wattal, C., Goel, N., Raveendran, R., Datta, S., & Prasad, K. (2012). Non-*albicans* *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *The Indian Journal of Medical Research*, 136, 997–1003. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023408-0>
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>
- Pereira, C. A., Domingues, N., Araújo, M. I. D. S. A., Junqueira, J. C., Back-Brito, G. N., & Jorge, A. O. C. (2016). Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.014>
- Ramage, G., & López-Ribot, J. L. (2005). Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods in Molecular Medicine*, 118, 71–79. <https://doi.org/10.1385/1-59259-943-5:071>
- Rochelle, S. L. de A., Sardi, J. de C. O., Freires, I. A., Galvão, L. C. de C., Lazarini, J. G., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2016). The anti-biofilm potential of



commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. *Industrial Crops and Products*, 87, 150–160.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.044>

Santos, J. S., Marinho, R. R., Ekundi-Valentim, E., Rodrigues, L., Yamamoto, M. H., Teixeira, S. A., ... Thomazzi, S. M. (2013). Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), 218–222.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.012>

Sellam, A., & Whiteway, M. (2016). Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. *F1000Research*, 5, 2582.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.9617.1>

Shao, L. C., Sheng, C. Q & Zhang, W. N. (2007). Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. *Yao Xue Xue Bao* (Chinês), 42, 1129-1136

Uppuluri, P., Pierce, C. G., & López-ribo, J. L. (2009). *Candida albicans* Biofilm Formation and its Clinical Consequences. *Future Microbiology*, 1235–1237.  
<https://doi.org/10.2217/fmb.09.85.Candida>

Weber, C. R., Soares, C. M. L., Lopes, A. B. D., Silva, T. S., Nascimento, M. S., Eulália, & Ximenes, C. P. a. (2011). *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. *Revista Brasileira de Farmácia*, 92, 235–244.

Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3, 1–11. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>

Wong, S. S. W., Samaranayake, L. P., & Seneviratne, C. J. (2014). In pursuit of the ideal antifungal agent for *Candida* infections: High-throughput screening of small molecules. *Drug Discovery Today*, 19, 1721–1730.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.009>

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados apontam que o extrato da casca de *A. colubrina* possui ação antifúngica e antibiofilme contra diferentes espécies de *Candida*. Apesar da moderada toxicidade *in vitro* frente a macrófagos RAW 264.7 o extrato apresentou baixa toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella*, o que mostra um potencial de segurança para seu possível uso. Tendo em vista o aumento da resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos usados atualmente para o tratamento da candidíase e o crescente surgimento de fungemia causada por parte de espécies *albicans* e não-*albicans*, *A. colubrina*, pode ser considerada como uma fonte de princípios ativos para o tratamento da candidíase. Seus compostos podem ser usados no desenvolvimento de um fitoterápico ou ainda para o planejamento e desenvolvimento de medicamentos alopáticos. Estudos clínicos são necessários para confirmação da sua eficácia e segurança no tratamento da candidíase oral.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P; LUCENA, R.F.P; MONTEIRO, J.M; FLORENTINO, A.T.N e ALMEIDA, C.D. F.C.B.R. Evaluating Two Quantitative Ethnobotanical Techniques. **Acta Botanica Brasilica**; v. 4, p. 51–60. Retrieved from <http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/237>, 2006.
- ALEXANDER, B.D; JOHNSON, M.D; PFEIFFER, C.D; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C; CATANIA, J; BOOKER, R; ... PFALLER, M.A. Increasing echinocandin resistance in candida glabrata: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**; v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 2013. <https://doi.org/10.1093/cid/cit136>.
- ARAÚJO, T.A; ALENCAR, N.L; AMORIM, E.L.C e ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**; v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.032>.
- BAKHSI, M; TAHERI, J.B; BASIR SHABESTARI, S; TANIK, A e PAHLEVAN, R. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. **Gerodontology**; v. 29, n. 2, p. 1–5, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2011.00544.x>.
- BRAND, A e GOW, N.A. Mechanisms of hypha orientation of fungi. **Current Opinion in Microbiology**; v. 12, n. 4, p. 350–357, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.007>.
- CAMPOS, V.A; PERINA, F.J; ALVES, E; SARTORELLI, J; MOURA, A.M e OLIVEIRA, D. F. Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. **Pest Management Science**; v. 70, n. 12, p. 1815–1822, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3722>.
- CAMPOY, S e ADRIO, J.L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**; pii: S0006-2952, n.16, p. 30422-1 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>.
- CANNON, R.D; LAMPING, E; HOLMES, A.R; NIIMI, K; BARET, P.V; KENIYA, M.V; ... MONK, B.C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**; v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>
- CARVALHO, A.C.B; NUNES, D.D.S.G; BARATELLI, T.D.G; SHUQAIR, N.S.M.S.A. Q e MANCHADO NETTO, E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**; v. 11, p. 26–32, 2007.
- CAVALCANTI, Y.W; MORSE, D.J; DA SILVA, W.J; DEL-BEL-CURY, A.A., WEI, X; WILSON, M; ... WILLIAMS, D. W. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. **Biofouling**; v. 31, n. 1, p. 27–38, 2015. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.996143>.

- CHANDRASEKAR, P. (2011). Management of invasive fungal infections: A role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; v. 66, n. 3, p. 457–465, 2011. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq479>.
- CORONADO-CASTELLOTE, L e JIMÉNEZ-SORIANO, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 5, n. 5, p. 279–286, 2013. <https://doi.org/10.4317/jced.51242>.
- DANGI, Y.S; SONI, M.L e NAMDEO, K.P. Oral candidiasis: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; v. 2, n. 1, p. 36–41, 2010.
- DEORUKHKAR, S.C SAINI, S e MATHEW, S. Non-albicans Candida Infection: An Emerging Threat. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**; 615958, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/615958>.
- DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunol Methods**; v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
- FREIRES, I.A; SARDI, J.C.O; CASTRO, R.D e ROSALEN, P.L. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharmaceutical Research**; 2016.<https://doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>.
- GARCIA-CUESTA, C; SARRION-PEREZ, M.G e BAGAN, J.V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 6, e576-82, 2014. <https://doi.org/10.4317/jced.51798>.
- GLEIZNYS, A; ZDANAČIENĖ, E e ŽILINSKAS, J. Candida albicans importance to denture wearers. A literature review. **Stomatologija Baltic Dental and Maxillofacial Journal REVIEWS Stomatologija Baltic Dental and Maxillofacial Journal**, v. 17, n. 2, p. 54–66, 2015.
- GUZMÁN-BLANCO, M; CASELLAS, J.M e SADER, H.S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. **Infectious Disease Clinics of North America**; v. 14, n. 1, p. 67–81, 2000.
- HANI, U; SHIVAKUMAR, H.G; VAGHELA, R; OSMANI, R.A.M e SHRIVASTAVA, A. Candidiasis: A fungal infection- current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 15, n. 1, p. 42–52, 2015. <https://doi.org/10.2174/1871526515666150320162036>.
- HOSHI, N; MORI, H; TAGUCHI, H; TANIGUCHI, M; AOKI, H; SAWADA, T e ... KIMOTO, K. Management of oral candidiasis in denture wearers. **Journal of Prosthodontic Research**; v. 55, n. 1, p. 48–52, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2010.03.004>.
- HOTWANI K; BALIGA, S; SHARMA, K. Phytodentistry: use of medicinal plants. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 11, n. 4, p. 2013–2015, 2014. <https://doi.org/10.1515/jcim-2013-0015>.

- INGLIS, D.O e SHERLOCK, G. Ras signaling gets fine-tuned: Regulation of multiple pathogenic traits of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 10, p. 1316–1325, 2013. <https://doi.org/10.1128/EC.00094-13>.
- JACOBSEN, I.D; WILSON, D; WÄCHTLER, B; BRUNKE, S; NAGLIK, J. R; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Talking Democracy**, v. 10, n. 1, p. 85–93, 2012. <https://doi.org/10.1586/eri.11.152>
- KABIR, M.A e AHMAD, Z. *Candida* infections and their prevention. **ISRN Preventive Medicine**, 2013, 763628. <https://doi.org/10.5402/2013/763628>.
- KUHN, D. M; CHANDRA, J; MUKHERJEE, P. K e GHANNOUM, M.A. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 70, n. 6, p. 878–888, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.878>.
- KURIYAMA, T; WILLIAMS, D.W; BAGG, J; COULTER, W.A; READY, D e LEWIS, M. A. O. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiology and Immunology**; v. 20, n. 6, p. 349–353, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00236.x>.
- LALLA, R. V; PATTON, L. L e DONGARI-BAGTZOGLU, A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. **Journal of the California Dental Association**, v. 41, n. 4, p. 263-268, 2013.
- LIMA, R.D.F; ALVES, É.P; ROSALEN, P.L; RUIZ, A.L.T.G; TEIXEIRA DUARTE, M.C; GÓES, V.F.F; COSTA, E.M.M.B. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**; 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/802696>.
- LIU, X; WANG, D; YU, C; LI, T; LIU, J e SUN, S. Potential Antifungal Targets against a *Candida* Biofilm Based on an Enzyme in the Arachidonic Acid Cascade-A Review. **Frontiers in Microbiology**; v. 7, p. 1–9, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01925>
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Cap. 4. 4º Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarium, 2002, 384 P.
- NUNES, L. E; VIANA, A.P.P; ROCHA, W.R.V; CINHA, V.D.S; CATÃO, R.M.R e COSTA, E.M.M.B. In vitro evaluation of antifungal activity and interactive effect of *Anadenanthera colubrina* (Benth). **African Journal of Microbiology Research**; v. 9, n. 36, p. 2006–2012, 2015. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7505>.
- MAUBON, D; GARNAUD, C; CALANDRA, T; SANGLARD, D e CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive Care Medicine**; v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3404-7>.

MAYER, F.L; WILSON, D e HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**; v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.

MEGAW, J; THOMPSON, T.P; LAFFERTY, R.A e GILMORE, B.F. *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Chemosphere**; v. 139, p. 197–201, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.026>.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**; v. 47, n. 2, p. 94–106, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.002>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-56, 1983.

OBEROI, J.K; WATTAL, C; GOEL, N; RAVEENDRAN, R; DATTA, S e PRASAD, K. Non-albicans *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 136, n. 6, p. 997–1003, 2012. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023408-0>.

PAPON, N; COURDAVAULT, V; CLASTRE, M d BENNETT, R.J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLoS Pathogens**; v. 9, n. 9, e1003550, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003550>.

PATIL, S; RAO, R.S; MAJUMDAR, B e ANIL, S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. **Frontiers in Microbiology**; v. 6, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>.

PEREIRA, C.A; DOMINGUES, N; ARAÚJO, M.I.D.S.A; JUNQUEIRA, J.C., BACKBRITO, G.N e JORGE, A.O.C. (2016). Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 85, n. 1, p. 66–72, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.014>

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Review**; v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.

PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.J; GIBBS, D.L; NEWELL, V.A; ELLIS, D; TULLIO, V; ... LING, T.A. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**; v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-09>

POLKE, M; HUBE, B e JACOBSEN, I.D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**; v. 91, p. 139-235, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>.



RAMAGE, G e LÓPEZ-RIBOT, J.L. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Methods in Molecular Medicine**; v. 118, p. 71–79, 2005. <https://doi.org/10.1385/1-59259-943-5:071>.

RAMAGE, G; RAJENDRAN, R; SHERRY, L e WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, 2012: 528521. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/528521>.

ROCHELLE, S.L.A; SARDI, J.C.O; FREIRES, I.A; GALVAO, L.C.C; LAZARINI, J.G; ALENCAR, S.M e ROSALEN, P.L. The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. **Industrial Crops and Products**; v. 87, p. 150–160, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.044>.

SALERNO, C; PASCALE, M; CONTALDO, M; ESPOSITO, V; BUSCIOLANO, M; MILILLO, L e ... SERPICO, R. *Candida*-associated denture stomatitis. **Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal**; v. 16, n. 2, p. 139-143, 2011. <https://doi.org/10.4317/medoral.16.e139>.

SANGLARD, D; COSTE, A e FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**; v. 9, n. 7, p. 1029–1050, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x>.

SARDI, J.C.O; ALMEIDA, A.M.F e MENDES GIANNINI, M.J.S. 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. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.007>.

SARDI, J.C.O; SCORZONI, L; BERNARDI, T; FUSCO-ALMEIDA, A. M e MENDES GIANNINI, M.J.S. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**; v. 62, p. 10–24, 2013. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>.

SELLAM, A e WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F1000Research**; v. 5, 2582, 2016. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9617.1>

SEN, T; SAMANTA, S.K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. *Adv Biochem Eng Biotechnol*; v. 147, p. 59-110, 2015. [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_273](https://doi.org/10.1007/10_2014_273).

SHAO, L. C; SHENG; C.Q e ZHANG, W. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. **Yao Xue Xue Bao** (Chinês), v. 42, n. 11, p. 1129-1136, 2007.

SHIELDS, R.K; NGUYEN, M.H; PRESS, E.G; UPDIKE, C.L e CLANCY, C.J. (2013). Caspofungin mics correlate with treatment outcomes among patients with *Candida glabrata* invasive candidiasis and prior echinocandin exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; v. 57, n. 8, p. 3528–3535, 2013.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00136-13>.

SILVA, N.C.C e FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**; v. 16, p. 402–413, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>.

SINHA, D e SINHA, A. Natural medicaments in dentistry. **AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)**; v. 35, n. 2, p. 113-118, 2014

<https://doi.org/10.4103/0974-8520.146198>.

SORGO, A.G; HEILMANN, C.J; DEKKER, H.L; BEKKER, M; BRUL, S; DE KOSTER, C.G d ... KLIS, F. M. Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus candida albicans. **Eukaryotic Cell**; v. 10, n. 8, p. 1071–1081, 2011. <https://doi.org/10.1128/EC.05011-11>.

SWAMY, M.K e SINNIAH, U.R. A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Pogostemon cablin Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. **Molecules**; v. 20, n. 5, p. 8521-8547, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20058521>.

SWAMY, M; SUDIPTA, K.M; LOKESH, P., NEEKI A, M., RASHMI, W., BHAUMIK H, S., ... KASHYAP, S. S. N. Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of Bougainvillea spectabilis flower extracts. **International Journal of Phytomedicine**; v. 4, p. 375–379, 2012.

UPPULURI, P; PIERCE, C.G e LÓPEZ-RIBOT, J.L. Candida albicans Biofilm Formation and its Clinical Consequences. **Future Microbiology**; v. 4, p. 1235–1237, 2009. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.85>.

VENGURLEKAR, S; SHARMA, R e TRIVEDI, P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. **Pharmacognosy Reviews**; v. 6, n. 12, p. 91–99, 2012. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.99942>.

WALKER, L.A; GOW, N.A.R e MUNRO, C.A. Elevated chitin content reduces the susceptibility of Candida species to caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; v. 57, n. 1, p. 146–154, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.01486-12>.

WEBER, C.R; SOARES, C.M.L; LOPES, A.B.D; SILVA, T.S; NASCIMENTO, M.S; EULÁLIA e XIMENES, C.P.A. (2011). Anadenanthera colubrina: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**; v. 92, n. 4, p. 235–244, 2011.

WHIBLEY, N e GAFFEN, S.L. Beyond Candida albicans: Mechanisms of immunity to non-albicans Candida species. **Cytokine**; v. 76, n. 1, p. 42–52.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.025>.

WILLIAMS, D e LEWIS, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**; v. 3, p. 1–11, 2011.



<https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>.

WONG, S.S.W; SAMARANAYAKE, L.P e SENEVIRATNE, C.J. In pursuit of the ideal antifungal agent for Candida infections: High-throughput screening of small molecules. **Drug Discovery Today**; v. 19, n. 11, p. 1721–1730, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.06.009>.

## APÊNCICE A – Detalhamento da metodologia

### 1. MATERIAL VEGETAL

As cascas da *A. colubrina* foram coletadas no mês de setembro, em região de semiárido, na cidade de Queimadas/Paraíba (7° 22' 25"S, 35° 59' 32" W). O material foi coletado em Setembro de 2015. Uma excicata foi depositada no herbário Manuel de Arruda Câmara da Universidade Estadual de Paraíba (Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil), sob nº 667/ ACAM.

### 2. OBTENÇÃO DO EXTRATO

As cascas de *A. colubrina* foram secas, moídas e imersas em etanol a 80%, numa proporção de 100g de casca para 250mL do solvente. O extrato hidroalcolóico foi obtido por meio do processo de maceração, por 48 horas, em temperatura ambiente e protegido da luz. A mistura resultante foi filtrada e os resíduos foram imersos em 80% de álcool etílico duas vezes adicionais. Após o processo de maceração, as três fases líquidas finais foram concentradas (álcool removido por evaporação à vácuo a 40°C - Quimis® / Q344 M) a 40° C, e em seguida foi liofilizado (Labconco® / Freezone 4.5).

Com reação ao perfil fitoquímico do extrato, em estudo prévio encontramos um elevado teor total de polifenóis (53,18% equivalentes ao ácido gálico), um total de 8,77 de taninos equivalente à catequinas e um teor de 0,28% de flavonoides equivalentes à quercetina (Lima et al., 2014).

### 3. CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO

Foi analisado o potencial anti-*Candida* e antibiofilme do extrato por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a técnica da microdiluição e da indução da formação de biofilme em fundo de microplaca, respectivamente.

#### 3.1 Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *Candida*: *Candida albicans* ATCC 5314, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 20019 e *Candida krusei* ATCC 6258. Foram usadas também dois isolados frescos de *Candida albicans* de lesões

de candidíase oral de pacientes da clínica-escola da Universidade Estadual da Paraíba, sob aprovação do comitê de ética desta instituição, em 15 de dezembro de 2015, com o número: 51779315.7.0000.5187.

### **3.2 Preparo do inóculo**

O inóculo foi preparado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2012). Culturas de leveduras de 24 horas foram adicionadas em 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) em tubos de ensaio e agitados em vórtex. Foi analisada a densidade óptica da solução em espectrofotômetro com comprimento de onda a 530 nm, ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a, para obtenção de uma suspensão de  $5,0 \times 10^6$  células/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura RPMI-1640, obtendo-se, ao final da mesma, uma quantidade de  $5,0 \times 10^3$  células/mL. Nos poços da microplaca, a solução final resultou em uma concentração de  $2,5 \times 10^3$  células/mL.

### **3.3 Determinação da concentração inibitória mínima pelo método da microdiluição em caldo**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços. Inicialmente, foram depositados 100  $\mu$ L/poço do meio de cultura RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA). Em seguida, acrescentou-se 100  $\mu$ L/poço do extrato, diluído em meio de cultura RPMI-1640 e 20% de DMSO, no poço inicial, numa concentração de 20 mg/mL. Procedeu-se a microdiluição, com a transferência de 100  $\mu$ L do conteúdo do primeiro poço para o seguinte. Este procedimento foi repetido até o último poço com obtenção das concentrações entre 5000 e 4.882  $\mu$ g/mL. Os 100  $\mu$ L finais foram desprezados. Posteriormente, 100  $\mu$ L da suspensão de *Candida* de 24 horas foram adicionados ( $5 \times 10^3$  UFC/mL). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C (CLSI 2012).

A nistatina (100  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como controle positivo. Foram analisados a esterilidade do meio de cultura e o controle de crescimento do microrganismo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, verificou-se alteração de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, indicativo de mudança do potencial

hidrogeniônico (pH), ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2012). Foram adicionados 30 µl de resazurina, observando também a mudança de cor de azul para rosa, que ocorre pelo mesmo princípio de mudança de cor do meio de cultura.

### **3.4 Determinação da concentração fungicida mínima**

Para determinar a atividade fungicida, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações igual e maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio ágar sabouraud dextrose (Merck®) e incubadas a 37°C por 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento visível do microrganismo (CLSI, 2012).

## **4. CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME**

### **4.1 Preparo do inóculo e formação do biofilme**

O inóculo foi preparado a partir de uma cultura de *Candida* de 24 horas. Colônias da cultura foram dissolvidas em 5 mL de meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) (Sigma-Aldrich), suplementado com glicose. A padronização do inóculo foi feita por espectrofotometria, obtendo-se densidade óptica entre 0,150 e 0,200, equivalente a uma concentração entre a  $10^7$  e  $10^8$  células/mL.

Para formação do biofilme foi utilizado como substrato o fundo de uma microplaca de 96 poços. Foram distribuídos em cada poço 100µL do inóculo dissolvido em meio de cultura YNB. Em seguida, amostra foi com incubada a 37° C por 24 horas.

### **4.2 Tratamento do biofilme**

O biofilme de 24 horas foi tratado com diferentes concentrações do extrato. Para isso, o meio de cultura YNB foi cuidadosamente retirado de cada poço, deixando aderido ao fundo do poço o biofilme formado. Posteriormente, cada poço foi lavado três vezes com solução salina (NaCl 0,9%), para remover as células não aderidas. As concentrações do extrato usadas no tratamento variaram entre 10 ou 100 e 500 vezes a CIM, dependendo da sensibilidade da cepa utilizada ao extrato.

A nistatina (Sigma-Aldrich) em concentração de 100 ou 300 µg/mL (a depender da sensibilidade da cepa utilizada), foi utilizada como controle positivo. O

controle negativo foi feito com a adição de RPMI-1640 no lugar do tratamento. Após a adição dos tratamentos a amostra foi incubada a 37 ° C por 24 horas.

#### **4.3 Quantificação das UFC/mL do biofilme**

Após as 24 horas de tratamento, o biofilme foi removido do fundo da placa e diluído até 10 vezes em solução de NaCl 0,9%. As últimas 5 diluições foram semeadas em placa de Petri, contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37° C por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

#### **4.4 Análise da morfologia celular**

Os biofilmes foram formados em lâminas (Lab-Tek, Nunc, Naperville, IL, EUA), como descrito no item 3.6.1. E foram tratados com diferentes concentrações do extrato. O controle negativo foi o RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). As células foram fixadas em glutaraldeído a 3% em uma solução tampão de fosfato à temperatura ambiente, durante 12 horas. O biofilme foi, então, desidratado em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 90 e 100%), metalizado com ouro e examinado por microscopia eletrônica de varredura (SEM; JEOL JSM 5600LV, JEOL Tóquio, Japão).

### **5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURA DE CÉLULAS MACRÓFAGOS RAW 264.7**

As células macrófagos RAW 264.7 foram obtidas no banco de células do Rio de Janeiro (ATCC, Rio de Janeiro, Brasil) e cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, 10 U/mL de penicilina, sulfato de estreptomicina 10 g/mL e L-glutamina (37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%). Com o objetivo de determinar os efeitos de *A. colubrina* sobre a viabilidade celular, foi utilizado o método de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). As células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10<sup>6</sup> células/poço) e incubadas por 24 h nas condições previamente descritas. As células foram tratadas com extrato de *A. colubrina* nas concentrações de 100, 390, 780, 1560, 3120, 6250, 12500, 25000 e 50000 µg/mL por 24 h. O grupo controle negativo recebeu DMSO a 0,5, 1 e 2% e o grupo controle positivo recebeu nistatina nas concentrações de 0,5, 1, 50, 100 e 500 µg/mL por 24 h. Foi utilizado um grupo para controle interno tratado

com meio de cultura. Após esse período, foram adicionados 200  $\mu$ L de uma solução de MTT (0,3 mg/mL) em cada poço e as placas incubadas por 3 horas, sob as mesmas condições. O sobrenadante foi removido e adicionado 200  $\mu$ L de DMSO 100% para lise das células. A absorbância foi medida a 470 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA (DENIZOT e LANG, 1986).

## **6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SISTÊMICA *in vivo* EM MODELO DE *Galleria Mellonella***

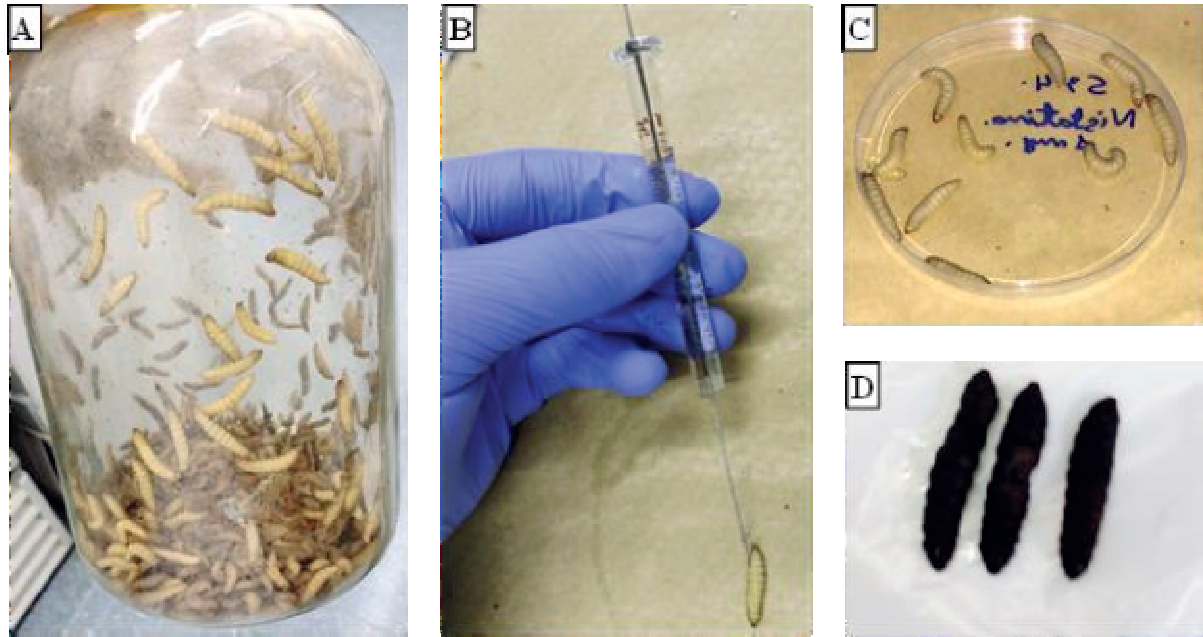
A toxicidade aguda sistêmica do extrato de *A. colubrina* foi avaliada *in vivo*, utilizando o modelo de larvas *Galleria mellonella*, com modificações anteriormente descritas (Megaw, Thompson, Lafferty, & Gilmore, 2015; Rochelle et al., 2016).

### **6.1 Seleção e preparo das larvas**

Foram selecionadas larvas com aparência saudável, verificada pela presença de movimentação normal e ausência de pigmentos. As larvas foram pesadas e apenas as larvas entre 200 e 300 mg foram usadas nos testes. Em seguida foram separadas aleatoriamente em grupos de 10 e resfriadas em freezer comum durante 20 minutos para imobilizá-las.

### **6.2 Injeção e análise das larvas**

Foram injetados 5  $\mu$ L do extrato nos grupos teste e 5  $\mu$ L do solvente (DMSO 20%) no grupo controle. A injeção foi feita no hemocelo de cada larva, através da última pró-pata esquerda, utilizando uma seringa Hamilton 25  $\mu$ L (Hamilton, Reno, NV) (Figura 3B). As larvas foram incubadas a 30°C e a sua sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados (a cada 9 horas) até 48 horas. As larvas que não apresentaram movimentos ao toque dorsal e que apresentaram melanização (Figura 3D) foram contadas como mortas (Rochelle et al., 2016).



**Figura 01.** Imagens gerais dos procedimentos com *Galleria mellonella*. (A). Recipiente onde as larvas são armazenadas. (B) Injeção da amostra na última pró-pata esquerda. (C) Armazenamento das larvas em placas descartáveis para posterior incubação. (D) Larvas com processo de melanização completo, indicando a sua morte e a toxicidade da dose utilizada.

## **ANEXO A – Normas do periódico Archives of Oral Biology, Qualis A2.**

### **ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY**

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

**ISSN:** 0003-9969

### **AUTHOR INFORMATION PACK**

#### **DESCRIPTION**

Archives of Oral Biology operates a web-based submission and review system. Please register at <http://ees.elsevier.com/aob> to submit a paper. Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the oral and craniofacial sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of craniofacial development and disease, including: Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Cellular microbiology Embryology Syndromology Forensic dentistry The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

#### **AUDIENCE**

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

#### **IMPACT FACTOR**

2015: 1.733 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

#### **ABSTRACTING AND INDEXING**

Abstracts in Anthropology

Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases

Agris

Animal Breeding Abstracts

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts

Arts and Humanities Citation Index

BIOBASE

BIOSIS



Elsevier BIOBASE  
Cancerlit  
Chemical Abstracts  
Current Contents/BIOMED Database  
Current Contents/Life Sciences  
Current Contents/SciSearch Database  
Current Contents/Science Citation Index  
Dairy Science Abstracts  
MEDLINE®  
Index Veterinarius  
Medical and Surgical Dermatology  
GeoRef  
Nutrition Research Newsletter  
Pascal  
Research Alert  
Review of Medical and Veterinary Entomology  
SPORTDiscus  
Science Citation Index  
Scisearch  
Soils and Fertilizers  
Sugar Industry Abstracts  
Tropical Diseases Bulletin  
UnCover  
Veterinary Bulletin  
Biological Abstracts  
Current Awareness in Biological Sciences  
CABI Information  
TOXFILE  
BIOSIS Previews

SIIC Data Bases

Inside Conferences

Gale Database of Publications & Broadcast Media

RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)

Inpharma Weekly

Pharmacoeconomics and Outcomes News

Reactions Weekly

Scopus

Global Health

Vitis Viticulture and Enology Abstracts

Nutrition Abstracts and Reviews Series

Pig News and Information

Zoological Record

ISI Science Citation Index

Abstracts of Mycology

AgBiotech News and Information

Maize Abstracts Online

Postharvest News and Information

Review of Agricultural Entomology

Small Animals

Soybean Abstracts (Online Edition)

Speleological Abstracts

BIOSIS Toxicology

## **GUIDE FOR AUTHORS**

### **Editors-in-Chief:**

**Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA Professor G B Proctor, London, UK**

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology

- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

### **Types of Contribution**

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed.

### **Page charges**

This journal has no page charges.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)

- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) Supplemental files (where applicable)

### **Further considerations**

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

#### **Human and animal rights**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

#### **Declaration of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

## **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

## **Contributors**

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

## **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

## **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their

manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

### **Elsevier Publishing Campus**

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **PREPARATION**

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**



## Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

### Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

### Materials and methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above.

### Results and findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names.

Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

### **Structured abstract**

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

**Formatting of funding sources** List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

**Funding:** This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'.

## Artwork

### Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. Formats.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### Please do not

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

## Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

## Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

## Reference style Text:

Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.



Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures.

Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.:

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply  $n=50$  when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that  $P=0.000$  (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is  $P$ .

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.