



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ERNANI CANUTO FIGUEIRÊDO JÚNIOR

**PROSPECÇÃO DOS EFEITOS ANTIFÚNGICO, CITOTÓXICO E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (LINN.) SKEEL**

Orientadora: JOZINETE VIEIRA PEREIRA MARQUES

CAMPINA GRANDE/PB
Junho de 2017

ERNANI CANUTO FIGUEIRÊDO JÚNIOR

**PROSPECÇÃO DOS EFEITOS ANTIFÚNGICO, CITOTÓXICO E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (LINN.) SKEEL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Estadual da Paraíba para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia. Área de concentração:
Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques

CAMPINA GRANDE/PB
Junho de 2017

É expressamente proibido 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 do trabalho.

F475p Figueiredo Júnior, Ernani Canuto.
Prospecção dos efeitos antifúngico, citotóxico e
antioxidante do extrato de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeel
[manuscrito] : / Ernani Canuto Figueiredo Junior. - 2017.
130 p.

Digitado.

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

"Orientação : Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques,
Departamento de Odontologia - CCBS."

1. Fitoterapia. 2. Antifúngicos. 3. Toxicidade. 4. Candidose
bucal.

21. ed. CDD 617.6

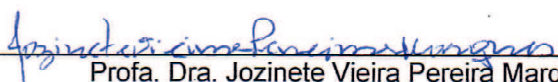
ERNANI CANUTO FIGUEIRÊDO JÚNIOR

PROSPECÇÃO DOS EFEITOS ANTIFÚNGICO, CITOTÓXICO E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (LINN.) SKEELS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade
Estadual da Paraíba em
cumprimento dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Clínica Odontológica.

DATA DA DEFESA: 20/06/2017

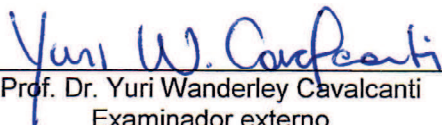
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques
Orientadora
Universidade Estadual da Paraíba



Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Examinador interno
Universidade Estadual da Paraíba



Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti
Examinador externo
Universidade Federal da Paraíba

“Vencer sem luta, é triunfar sem glória”

(Provérbio popular)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Senhor de todas as coisas, pelo dom da vida e por todas as bênçãos, graças e maravilhas concedidas em minha vida. Agradeço de modo especial por permitir-me galgar passos que me trouxeram até aqui. Rendo-te honras de glória e louvor pois mesmo em meio às dificuldades sempre entreguei nas tuas mãos confiado que o seu “sim” seria maior que tudo e todas as coisas e que esse objetivo iria tornar-se real.

Aos meus pais Ernani e Guiomar, e ao meu irmão Guilherme, por constituírem essa base familiar tão sólida e especial. Agradeço-lhes por todo o amor, todo o apoio e incentivo que sempre deram em todos os momentos da minha vida, e em especial nessa fase ímpar, na qual demonstraram sempre acreditar em mim e apoiar-me. Dedico essa conquista a vocês, pois se vocês não tivessem apoiado e propiciado todas as condições para a realização dessa conquista, essa meta não teria sido alcançada e não teria sido a mesma. Amo vocês mais que tudo, agradeço e louvo a Deus por suas vidas e por tudo o que vocês representam para mim.

A minha orientadora, professora Jozinete Vieira Pereira, pelo profissionalismo e postura ética que sempre manteve em todos os momentos durante essa trajetória acadêmica. Agradeço pelo carinho, respeito e pela relação fraternal desenvolvida durante nossa convivência, e por fazer-me sempre acreditar que tudo daria certo. Serei sempre grato, e levarei sempre comigo seu exemplo.

A todos os colegas de turma por terem ser tornado irmãos e presentes de Deus que o mestrado proporcionou para mim. Por todos os momentos de aprendizados, crescimento intelectual e de amadurecimento pessoal. A batalha não seria a mesma se os personagens não fossem esses. Amo todos vocês e os levarei sempre em meu coração com muito carinho, respeito e admiração.

Aos colegas Diego e Carolina pelos ensinamentos e treinamentos dados durante a minha aprendizagem nos experimentos de Microbiologia. Agradeço a vocês e rogo a Deus que os abençoe e capacite cada vez mais na transmissão dos conhecimentos.

Aos demais amigos, em especial Rodrigo, Anderson, Paulo, Francisco Marto, Fernando, Raquel, Vivi, Susaninha, Savana, Lília e Damião. Agradeço a cada um

pela fiel amizade e companheirismo que sempre tiveram em todos os momentos. Agradeço pelo apoio, incentivo e pelas boas vibrações e energias que vocês sempre transmitiram em todos os momentos da minha vida, e de modo especial nessa fase do mestrado.

A todos os professores Programa de Pós-Graduação em Odontologia agradeço imensamente pelo compromisso e dedicação com a nossa formação, pelo carinho com a nossa turma e por todos os ensinamentos repassados.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia pela amizade, carinho e colaboração nos vários momentos durante essa jornada.

Ao professor Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti pela amizade, colaboração e ensinamentos transmitidos nas diversas fases dessa pesquisa, desde a elaboração da metodologia da nossa pesquisa, aos ensinamentos de testes microbiológicos, e até a fase final dessa jornada.

A professora Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros pela amizade, consideração e prontidão que sempre demonstrou nos momentos em que precisei de sua ajuda e apoio e sempre tive sua colaboração e auxílio. Agradeço também pela disposição em colaborar com seus conhecimentos nessa etapa importante de finalização dessa etapa, como membro da banca de apresentação da dissertação.

A professora Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa pela amizade, carinho e pelo exemplo de brilhantismo, empenho e dedicação com a qual conduz e coordena as atividades do Laboratório de Análises e Diagnóstico, sempre buscando melhorias e aprimoramento para a consolidação e crescimento do laboratório, sempre visando o melhor para que as equipes possam desenvolver as atividades da melhor forma possível.

A professora Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa e a doutoranda Andressa Brito Lira pela parceria, apoio e colaboração durante a realização dos experimentos realizados no âmbito da Universidade Federal da Paraíba.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e pelo auxílio financeiro que tornaram viável a realização dessa pesquisa.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels sobre cepas do gênero *Candida*, bem como investigar o efeito citotóxico e antioxidante. O método de extração utilizado para obtenção do extrato foi a percolação. O extrato foi quimicamente caracterizado por meio de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa. A atividade antifúngica do extrato foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Fungicida Mínima sobre *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC 750) e cepas clínicas de *C. albicans* (LM1) e *C. albicans* (LM3) e da avaliação do seu efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231). Testes de citotoxicidade foram realizados a partir dos ensaios de hemólise e fragilidade osmótica em eritrócitos humanos, além da avaliação do seu potencial oxidante e antioxidante na presença de fenilhidrazina e espécies reativas de oxigênio, respectivamente. Os dados do ensaio do extrato sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* foram avaliados através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, enquanto os testes de citotoxicidade foram avaliados através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett. Ambos foram realizados admitindo-se um valor $\alpha=0,05$. Mediante a análise fitoquímica, um total de 35 compostos foram identificados, sendo 2,2-Dimetoxibutano; 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-; 5-Hidroximetilfurfural; 2,4-Di-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furan-3-ona e Ácido propanodioico, dimetil éster as substâncias majoritárias presentes no extrato. O extrato demonstrou valores de CIM entre 31,25 e 125 $\mu\text{g/mL}$ e de CFM entre 250 e $>1000 \mu\text{g/mL}$, com efeito fungistático sobre as cepas testadas, sendo esse mais significativo em um período de oito horas de exposição à *C. albicans*. Nas concentrações capazes de exercer efeito inibitório mínimo sobre o crescimento fúngico, o extrato demonstrou baixa atividade hemolítica, exercendo efeito protetor sobre a hemólise induzida por estresse osmótico quando utilizado nessas mesmas concentrações, de acordo com o tipo sanguíneo. Em concentrações de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ o extrato demonstrou efeito antioxidante frente a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, apesar de não demonstrar ação antioxidante frente a fenilhidrazina. Além disso, sua utilização em concentrações $\leq 125 \mu\text{g/mL}$ não induz a ocorrência de oxidação nos eritrócitos. Diante dos resultados obtidos, o extrato demonstrou potencial antifúngico promissor, apresentando baixo efeito citotóxico sobre eritrócitos, oferecendo efeito protetor sobre células expostas a situações de estresse osmótico e oxidativo.

Palavras-chave: *Syzygium jambolanum*; Agentes antifúngicos; Testes de toxicidade

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the antifungal potential of the *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels leaves' hydroalcoholic extract on strains of the *Candida* genre, as well as to investigate its cytotoxic and antioxidant effect. The percolation method was used to obtain the extract. The extract was chemically characterized through gas chromatography combined with mass spectrometry. The extract's antifungal activity was determined through Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicide Concentration over *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC 750)) as well as *C. albicans* (LM1) and *C. albicans* (LM3) clinical strains and through the evaluation of its effect over the *C. albicans* (ATCC 10231) growth kinetics. Cytotoxicity tests were done from the hemolysis and osmotic fragility experiments in human erythrocytes as well as the extract's oxidant and antioxidant potentials in the presence of phenylhydrazine and reactive oxygen species, respectively. The data about the extract's essay over *C. albicans* growth kinetics were evaluated by the ANOVA test and by the post-tests of Tukey, while the cytotoxicity tests were evaluated by the ANOVA test and by the post-tests of Dunnett. Both were done taking into consideration the value $\alpha=0,05$. By the phytochemical analysis, a total of 35 compounds were identified, knowing that 2,2-Dimethoxybutane; 4H-Pyran-4-one,2,3-di-hydro-3,5-di-hydroxy-6-methyl-; 5-Hydroxymethylfurfural; 2,4-Di-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H) -furan-3-one, propanedioic acid and dimethyl ester were the main substances found in the extract. The extract showed MIC values among 31,25 and 125 $\mu\text{g/mL}$ and MFC among 250 and >1000 $\mu\text{g/mL}$, with fungistatic effect over the tested strains, mainly after they were exposed to the *C. albicans* for a period of eight hours. In those concentrations that can have a minimum inhibitory effect over the fungal growth, the extract showed a low hemolytic activity, having a protective effect over osmotic stress induced hemolysis, at the same concentrations, depending on the blood type used. In concentrations of 31,25 and 62,5 $\mu\text{g/mL}$, the extract shows an antioxidant effect in relation to oxidative stress induced by hydrogen peroxide, though it does not demonstrate any antioxidant action when exposed to phenylhydrazine. Besides, it does not induce oxidation in the erythrocytes when used in concentrations ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$. Based on these results, the extract showed a promising antifungal potential, manifesting a low cytotoxic effect over the erythrocytes, offering a protective effect over cells that were exposed to osmotic and oxidative stress situations.

Key words: *Syzygium jambolanum*; Antifungal agents; Toxicity tests.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection

ANOVA- Análise de Variância

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical Laboratory and Standards Institute

CNS- Conselho Nacional de Saúde

d.p. - Desvio padrão da média

e.p.m. - Erro padrão da média

EROs - Espécies reativas de oxigênio

eV- Elétron-volt

g - Grama

h - Hora

Hb - Hemoglobina

HULW - Hospital Universitário Lauro Wanderley

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico

L – Litro

LABDEM- Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos

LAQUISA- Laboratório de Análises Química e Ambiental

mg - Miligrama

mHb - Metahemoglobina

min - Minuto

mL – Mililitro

mL min⁻¹ – Mililitro por minuto

mM - Milimol

mmol/L - Milimol por litro

NaCl - Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

mm- Milímetro

m/z- Massa/carga

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

NaH₂PO₄·2H₂O - Fosfato de potássio monobásico hidratado

Na₂HPO₄·12H₂O - Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado

OH⁻ - Íons hidroxila

O²⁻ - Íon superóxido

¹O₂ - Oxigênio singlete

PBS - Tampão fosfato salino

pH - Potencial Hidrogeniônico

rpm - Rotações por minuto

SUS- Sistema Único de Saúde

UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

UEPB - Universidade Estadual da Paraíba

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

x - Vezes

°C - Graus Celsius

µg/mL - Micrograma por mililitro

µL – Microlitro

µm - Micrômetro

± - Mais ou menos

%- Porcento

< - menor que

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Visão geral da árvore de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, com detalhes para as flores, frutos e folhas.
(Imagens A, B e C:<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Syzygium+cumini>;
ImagemD:http://s262.photobucket.com/user/7_Heads/media/Fruit%20Trees/Syzygium_cumini_00.jpg.html).....23

Artigo 1 - Análise fitoquímica e investigação do potencial antifúngico do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Figura 1. Efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e Nistatina sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231). Resultados expressos através da média do número de micro-organismos (em UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação sob exposição ao extrato e a Nistatina.....64

Artigo 2 - Investigação dos potenciais citotóxico, oxidante e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Figura 1- Efeito hemolítico induzido pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O em comparação com o controle negativo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).88

Figura 2- Atividade anti-hemolítica induzida pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O quando em solução hipotônica (NaCl 0,24 %). Os resultados foram obtidos em comparação com o controle positivo e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$)91

Figura 3 - Atividade antioxidante do extrato das folhas de *S. cumini* frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo AB. Os resultados foram obtidos em comparação com o controle positivo e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).93

Figura 4 - Atividade oxidante e antioxidante do extrato das folhas de *S. cumini* sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo AB. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de metahemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle negativo (ensaio oxidante) e controle positivo (ensaio antioxidante). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$)94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Algumas atividades biológicas e respectivos compostos fitoquímicos responsáveis por tais ações.....	24
Quadro 2- Utilização terapêutica de diferentes partes da estrutura anatômica de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels com interesse e aplicabilidade na Odontologia.....	25
Quadro 3- Evidências de estudos demonstrando atividade antibacteriana de extratos de diferentes regiões anatômicas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels sobre micro-organismos de interesse para a Odontologia.....	26
Quadro 4- Evidências de estudos demonstrando atividade antifúngica de extratos de diferentes regiões anatômicas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels sobre o gênero <i>Candida</i>	27
 Artigo 1 - Análise fitoquímica e investigação do potencial antifúngico do extrato de folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	
Quadro 1- Identificação dos compostos presentes no extrato das folhas de <i>Syzygium cumini</i> por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (coluna capilar HP-5MS)	61
Quadro 2- Identificação dos compostos presentes no extrato das folhas de <i>Syzygium cumini</i> por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (Coluna SPB – 624)	62

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Análise fitoquímica e investigação do potencial antifúngico do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Tabela 1- Atividade antifúngica do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e de fármacos padrão sobre fungos do gênero *Candida* (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL).63

Tabela 2- Efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e da Nistatina sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) (valores expressos em média do número de UFC/mL). Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa.....66

Artigo 2 - Investigação dos potenciais citotóxico, oxidante e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Tabela 1- Percentual de hemólise promovida pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O, em comparação ao controle positivo.89

Tabela 2- Percentual de hemólise promovida pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl ,24%).....92

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Fungos do gênero <i>cândida</i> : formação de biofilmes e seu envolvimento na etiologia e patogenia da candidose.....	17
2.2 Candidose bucal.....	19
2.3 A utilização popular de plantas medicinais como modalidade terapêutica alternativa e seus reflexos nas pesquisas em fitoterapia.....	20
2.4 <i>Syzygium cumini</i> (L) SKEEL.....	22
2.5 Estudos de citotoxicidade de plantas medicinais.....	28
2.5.1 Avaliação do potencial hemolítico de plantas medicinais e/ou seus extratos.....	29
2.5.2 Avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária frente à exposição a plantas medicinais e/ou seus extratos.....	31
2.5.3 Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, dano oxidativo e o papel de substâncias antioxidantes endógenas e exógenas na regulação desses efeitos.....	32
2.5.4 Avaliação do potencial antioxidante de plantas medicinais e/ou seus extratos.....	33
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Delineamento do estudo.....	36
4.2 Local de pesquisa.....	36
4.3 Material botânico e processamento vegetal.....	36
4.4 Análise fitoquímica.....	37
4.4.1 Método de extração das amostras.....	37
4.4.2 Extração líquido-líquido.....	38
4.4.3 Método cromatográfico.....	38
4.5 Micro-organismos envolvidos e preparo do inóculo.....	39
4.6 Reativação dos micro-organismos.....	40

4.7 Determinação da atividade antifúngica.....	40
4.8 Efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de <i>Candida</i>	42
4.9 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos.....	43
4.9.1 Material biológico.....	43
4.9.2 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos.....	43
4.9.3 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos.....	44
4.9.4 Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de espécies reativas de oxigênio.....	45
4.9.5 Avaliação do potencial oxidante e do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina.....	46
4.10 Análise estatística	47
5 ASPECTOS ÉTICOS.....	48
6 RESULTADOS	49
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS.....	117
Anexo A – Parecer do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos – UEPB.....	117
Anexo B – Normas da revista Archives of Oral Biology.....	120

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A candidose bucal é considerada um problema de saúde pública, que apresenta elevada prevalência e morbidade, apresentando fatores de risco como imunossupressão; uso de antibióticos de largo espectro; higiene bucal deficiente e uso de próteses dentárias (GOW et al, 2011; PELEG et al, 2010; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011).

O micro-organismo *Candida albicans* é o mais prevalente nessas infecções, e geralmente está associado a outras espécies (PELEG et al, 2010; ZOMORODIAN et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011), como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* (THEIN et al, 2009; RODRIGUES et al, 2014; MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015; PSEE et al, 2016) formando biofilmes na cavidade bucal (MARTINS et al, 2016). Nesse sentido, a associação de *C. albicans* com bactérias e outras espécies de *Candida* pode provocar o aumento da patogenicidade dessa infecção (DIAZ et al, 2012; XU et al, 2014; CAVALCANTI et al, 2015; CAVALCANTI et al, 2016). Frente a ocorrência do aparecimento de patógenos resistentes e da toxicidade dos antifúngicos, tem-se incentivado a busca ativa por novos agentes antifúngicos (FENNER et al, 2006; COSTA et al, 2009; COLEMAN et al, 2010; PEREIRA et al, 2016), direcionando-se um maior interesse para a investigação de substâncias com atividade biológica dessa natureza, visando integrá-las como novas modalidades terapêuticas complementares (KARYGIANNI et al, 2016).

Uma vez que pesquisas voltadas para a investigação da ação antifúngica de plantas e/ou extratos vegetais podem fornecer resultados promissores, tais investigações podem oferecer perspectivas para a elucidação de possibilidades terapêuticas adicionais direcionadas à espécies fúngicas do gênero *Candida*, podendo, portanto, vir a constituir uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções bucais causadas por esses micro-organismos (COSTA et al, 2009).

Syzygium cumini (L.) Skeels, Myrtaceae, popularmente conhecida como jabolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva (MIGLIATO et al, 2006; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013) possui tradição e uso na medicina popular para diversas indicações terapêuticas, apresentando relatos de diversas ações farmacológicas como efeitos hipoglicemiantes, antimicrobianos e anti-inflamatórios (MIGLIATO et al,

2006; MIGLIATO et al, 2007; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012), demonstrando um valor terapêutico promissor (GOWRI; VASANTHA, 2010).

As investigações prévias com o extrato hidroetanólico de folhas de *S. cumini* demonstraram atividade antifúngica com potencial ação inibitória sobre o crescimento de *C. albicans*, evidenciando resultados promissores acerca do efeito antifúngico dessa planta. Assim, os achados sinalizam a necessidade de maiores investigações do extrato de *S. cumini* como potencial agente alternativo para o tratamento antifúngico sobre espécies de *Candida* (PEREIRA et al, 2016). Desse modo, salienta-se a necessidade da realização de estudos destinados à bioprospecção do extrato à base das folhas de *S. cumini*, com o objetivo de confirmar e reiterar a presença de atividade biológica antifúngica, além de realizar estudos adicionais acerca da avaliação de aspectos relativos à eficácia e segurança do uso desse produto vegetal, visando assim a assegurar a garantia do controle de qualidade para seu uso e indicação (NOLDIN et al, 2003; VARANDA, 2006).

Nesse contexto, diante do exposto o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels sobre cepas do gênero *Candida*, bem como investigar o efeito citotóxico e antioxidante.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos do gênero *Candida*: formação de biofilmes e seu envolvimento na etiologia e patogenia da candidose

Os fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana normal e são frequentemente encontrados colonizando diversos sítios epiteliais e mucosos, dentre estes a cavidade bucal (ALVES et al, 2014; GULATI; NOBILE, 2016; THEIN et al, 2006).

Dentre as diferentes espécies de *Candida*, *C. albicans* pode ser isolado tanto como um micro-organismo comensal quanto como um patógeno oportunista o qual pode causar o estabelecimento da candidose, inclusive afetando a cavidade bucal (RODRIGUES et al, 2014; MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015; SILVA-ROCHA et al, 2015), de interesse, portanto, na clínica odontológica.

Esse gênero inclui fungos que constituem o agente etiológico de infecções que apresentam intensidade variável, abrangendo desde as de natureza superficial, até as mais graves e que causam candidose disseminada, com comprometimento sistêmico (THEIN et al, 2006).

Sabe-se que os micro-organismos apresentam capacidade de interagir entre si, podendo formar e manter biofilmes, agregando-se à estruturas inertes ou a tecidos biológicos (THEIN et al, 2006; THEIN et al, 2009; PELEG et al, 2010; GULATI; NOBILE, 2016). Tal interação pode ser favorecida por fatores como modificações microambientais, a exemplo de alterações moleculares e produção de metabólitos teciduais; interações físicas, permitindo a ligação e colonização dos micro-organismos; além de mudanças na resposta imune do hospedeiro, a qual pode propiciar condições para a instalação dos micro-organismos e o desenvolvimento de processos patológicos, dentre outros (PELEG et al, 2010).

Assim, ao mesmo tempo em que possibilitam a ocorrência de interações entre os micro-organismos, esses fatores influenciam também no seu crescimento e sobrevivência, podendo atuar beneficiando ambas as espécies ou atuar de modo seletivo sobre uma espécie em detrimento da outra (PELEG et al, 2010; GULATI; NOBILE, 2016).

Fungos do gênero *Candida* podem formar biofilmes através da associação com outras espécies fúngicas (SANTOS et al, 2016; THEIN et al, 2006; THEIN et al., 2009) ou bacterianas (THEIN et al, 2006; GULATI;NOBILE, 2016). Nesse último aspecto, é atribuído como o gênero fúngico mais associado em infecções mistas (PELEG et al, 2010; GULATI;NOBILE, 2016).

Embora *C. albicans* constitua a espécie mais envolvida na etiologia da candidose, outras espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* vem se destacando como patógenos oportunistas envolvidos na etiologia dessa infecção, adquirindo importância clínica significativa. Esta relevância está relacionada sobretudo ao fato de causar quadros consideráveis de morbidade e mortalidade (THEIN et al, 2009; SANTOS et al, 2016), principalmente em casos de imunossupressão do hospedeiro (RODRIGUES et al, 2014) e em condições hospitalares (DOI et al, 2016; RODRIGUES et al, 2014; SAVASTRANO et al, 2016).

Tal fato decorre em virtude do aumento da patogenicidade observado através da associação de *C. albicans* com outras espécies de *Candida* em biofilmes. Estas são evidenciadas por meio do aumento da proporção de hifas, maior expressão gênica de fatores de virulência e maior padrão de invasão e dano tecidual (DIAZ et al, 2012; XU et al, 2014; CAVALCANTI et al, 2015; CAVALCANTI et al, 2016).

Nesse sentido, a associação dessas diferentes espécies de micro-organismos tem oferecido um desafio terapêutico ao tratamento antimicrobiano, cuja relevância clínica está relacionada à diminuição da susceptibilidade dos micro-organismos e/ou à resistência microbiana frente aos agentes tradicionalmente empregados na terapêutica antifúngica como fluconazol, itraconazol, miconazol e anfotericina B (THEIN et al, 2009; DOI et al, 2016; GULATI; NOBILE, 2016; SAVASTRANO et al, 2016).

Assim, essa questão sinaliza e evidencia um potencial problema de saúde pública, ao mesmo tempo em que sugere a necessidade da realização de práticas de vigilância direcionada a micro-organismos de patogenicidade emergente (DOI et al, 2016; SAVASTRANO et al, 2016), bem como direciona à necessidade da investigação de métodos antifúngicos alternativos, sobretudo aqueles que utilizem produtos à base de plantas medicinais e/ou seus extratos. Desse modo, destaca-se, sobretudo na prática Odontológica, aqueles direcionados para o controle químico do biofilme bucal (KARYGIANNI et al, 2016).

2.2 Candidose bucal

Na cavidade bucal, *C. albicans* pode ser isolado tanto como um micro-organismo comensal quanto como um patógeno oportunista, associado ao estabelecimento da candidose (RODRIGUES et al, 2014; MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015; SILVA-ROCHA et al, 2015) a qual pode apresentar manifestações clínicas variáveis através das formas pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica e queilite angular (MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015).

Candida albicans constitui o principal agente etiológico da candidose bucal (PELEG et al, 2010; SILVA et al, 2011; ZOMORODIAN et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011; ALVES et al, 2014). No entanto, outras espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* tem sido também comumente associadas com essa infecção (THEIN et al, 2009; RODRIGUES et al, 2014; MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015; MARTINS et al, 2016; PSEE et al, 2016).

Alguns dos principais fatores de risco associados a ocorrência da candidose incluem desde fatores gerais e de natureza sistêmica, como estados imunossupressão (ALVES et al, 2014; GULATI; NOBILE, 2016; SILVA et al, 2011); e utilização de antibióticos de largo espectro, além também de fatores bucais locais como utilização de próteses dentárias e higiene bucal deficiente (THEIN et al, 2009; PELEG et al, 2010; GOW et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011; SILVA-ROCHA et al, 2015), sendo esses últimos de interesse na prática odontológica.

Uma vez que as próteses dentárias oferecem meios propícios para facilitar a colonização e formação de biofilme, esses dispositivos encontram-se frequentemente colonizadas por fungos do gênero *Candida* (MARTINS et al, 2016; PEREIRA et al, 2016), podendo levar ao estabelecimento de candidose associada a utilização dessas próteses (PEREIRA et al, 2016).

Essa forma de candidose bucal pode envolver as diversas espécies fúngicas mencionadas (MARTINS et al, 2016), de modo que a co-infecção de micro-organismos, é capaz de proporcionar efeitos patogênicos mais consideráveis (PELEG et al, 2010; ZOMORODIAN et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011;

WILLIAMS et al, 2011; MARTINS et al, 2016), sobretudo em estágios mais avançados das lesões (PEREIRA et al, 2016).

Nesses casos, nas associações entre os diferentes micro-organismos, a co-infecção de *C. albicans* e *C. glabrata*, por exemplo tem demonstrado maior patogenicidade (MARTINS et al, 2016). Em virtude da ocorrência de mudanças na atividade metabólica, sobretudo após períodos mais prolongados de maturação do biofilme; aumento na proporção de leveduras (MARTINS et al, 2016) e maior expressão de fatores de virulência como proteinases, fosfolipases, lipases, condroitinases e hemolisinas (PEREIRA et al, 2016). Assim, percebe-se que ao mesmo tempo em que torna viável uma maior capacidade de colonização fúngica, a associação de micro-organismos distintos pode promover uma maior patogenicidade, com maior padrão de invasão e dano tecidual (ALVES et al, 2014).

Assim, uma vez compreendido o envolvimento e interação das diferentes espécies de *Candida* na etiologia da candidose bucal, percebe-se a necessidade de buscar novas estratégias terapêuticas, direcionados para o tratamento dessa infecção (SILVA et al, 2011), sobretudo utilizando-se substâncias provenientes de plantas medicinais e/ou seus extratos.

2.3 A utilização popular de plantas medicinais como modalidade terapêutica alternativa e seus reflexos nas pesquisas em fitoterapia

A utilização de plantas medicinais para fins curativos é uma prática que tem origens antigas (BRASIL, 2006). Desde os primórdios da humanidade e durante um longo período de tempo, as plantas constituíram a única fonte de substâncias para as quais os homens dispunham para utilização com finalidades terapêuticas (MIGLIATO et al, 2007).

Assim, seu emprego está intrinsecamente relacionado com os primórdios da medicina, em virtude do seu uso como base para tratamento de diversas doenças (BRASIL, 2006), ao mesmo tempo que representou durante longo tempo a fonte primária de substâncias medicamentosas e de matéria-prima para a produção e desenvolvimento de medicamentos (MIGLIATO et al, 2007).

A indicação das plantas medicinais esteve embasada sobretudo através das informações provenientes de conhecimentos culturais e populares repassados de geração em geração (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; BRASIL, 2006), sendo tal prática ainda percebida da realidade.

Paralelamente, a indicação popular acerca da utilização de espécies vegetais para o tratamento de doenças constitui um método importante para a abordagem, indicação e seleção de plantas com potencial farmacológico, de modo a contribuir para a indicação de investigações destinadas à elucidação e comprovação científica de sua ação e eficácia, permitindo identifica-las como fonte promissora para a descoberta de novos agentes terapêuticos alternativos para o tratamento de doenças (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Embora a medicina se encontre em um estágio técnico-científico desenvolvido na maior parte do mundo, 80% da população de países em desenvolvimento ainda depende e dispõe primariamente apenas de recursos e práticas tradicionais para a realização dos cuidados básicos de saúde (BRASIL, 2006; JENNIFER et al, 2007). Além disso, nesses países a utilização de terapêuticas tradicionais à base de plantas também está relacionada à sua biodiversidade (BRASIL, 2006; BRASIL, 2006), sendo este um fator que faz com que o emprego de plantas medicinais assuma um percentual significativo de utilização como modalidade terapêutica elementar (BRASIL, 2006).

Frente a esse cenário de biodiversidade, o Brasil apresenta uma posição de destaque especial, sobretudo em virtude de abrigar biomas como a floresta amazônica, berço da maior biodiversidade vegetal do mundo. Além disso, destaca-se também a ampla diversidade étnica e cultural detentora de um valioso conhecimento tradicional acerca do uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006; BRASIL, 2006).

Desse modo, esses aspectos fazem com que o país apresente um grande potencial para a exploração de plantas medicinais, inclusive no que se refere a realização de pesquisas voltadas para o estudo e desenvolvimento de novas drogas, à base de fitoterápicos ou para produção de drogas sintéticas obtidas através da matéria-prima vegetal (BRASIL, 2006; BRASIL, 2006). Assim, ao constituírem-se a maior fonte “natural” para uma infinidade de compostos, as plantas medicinais apresentam um potencial papel ao proporcionar a descoberta de novas substâncias

e/ou compostos com ação biológica que possam orientar para a posterior produção de medicamentos e/ou formulações fitoterápicas (MACIEL et al, 2002; FENNER et al, 2006; CHAGAS et al, 2015).

Além da grande aceitação que a utilização de plantas medicinais vêm adquirindo enquanto modalidade terapêutica alternativa (NOLDIN et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2007) sua indicação e uso tem encontrado terreno fértil também através do papel das políticas públicas voltadas para a consolidação dessa área. Dentre essas, destaca-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e sobretudo a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que especificamente em relação a essa última, destaca-se dentre outras diretrizes, a necessidade do incentivo e fomento à formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2006).

Diante do exposto, a crescente ênfase dada à utilização da fitoterapia vem também contribuindo para a expansão de sua indicação e utilização na Odontologia, dado o grande número de plantas medicinais com relatos de indicação e uso no tratamento de afecções que acometem a cavidade bucal (OLIVEIRA et al, 2007). Desse modo, esse fato direciona para a necessidade da realização de pesquisas com plantas medicinais com potencial aplicação e utilização na Odontologia. (OLIVEIRA et al, 2007).

2.4 *Syzygium cumini* (L) SKEEL

A planta *Syzygium cumini* (L.) Skeel conhecida por outras denominações como *Syzygium jambolanum*, *Eugenia jambolana*, *Eugenia cumini*, pertence à família Myrtaceae (Figura 1). É nativa das regiões tropicais, embora possa ser encontrada em algumas regiões subtropicais. Distribui-se particularmente no continente asiático, em países como Índia, Tailândia, Filipinas; continente africano, em países como África do Sul, Madagascar e outros do leste do continente. Além disso, pode ser encontrada na América do Sul, e inclusive no Brasil (planta naturalizada), onde encontra-se distribuída nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte, sendo conhecida por denominações populares diversas, tais como jambolão,

azeitona, azeitona-roxa, oliva (MIGLIATO et al, 2006; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012; BALIGA et al, 2013; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

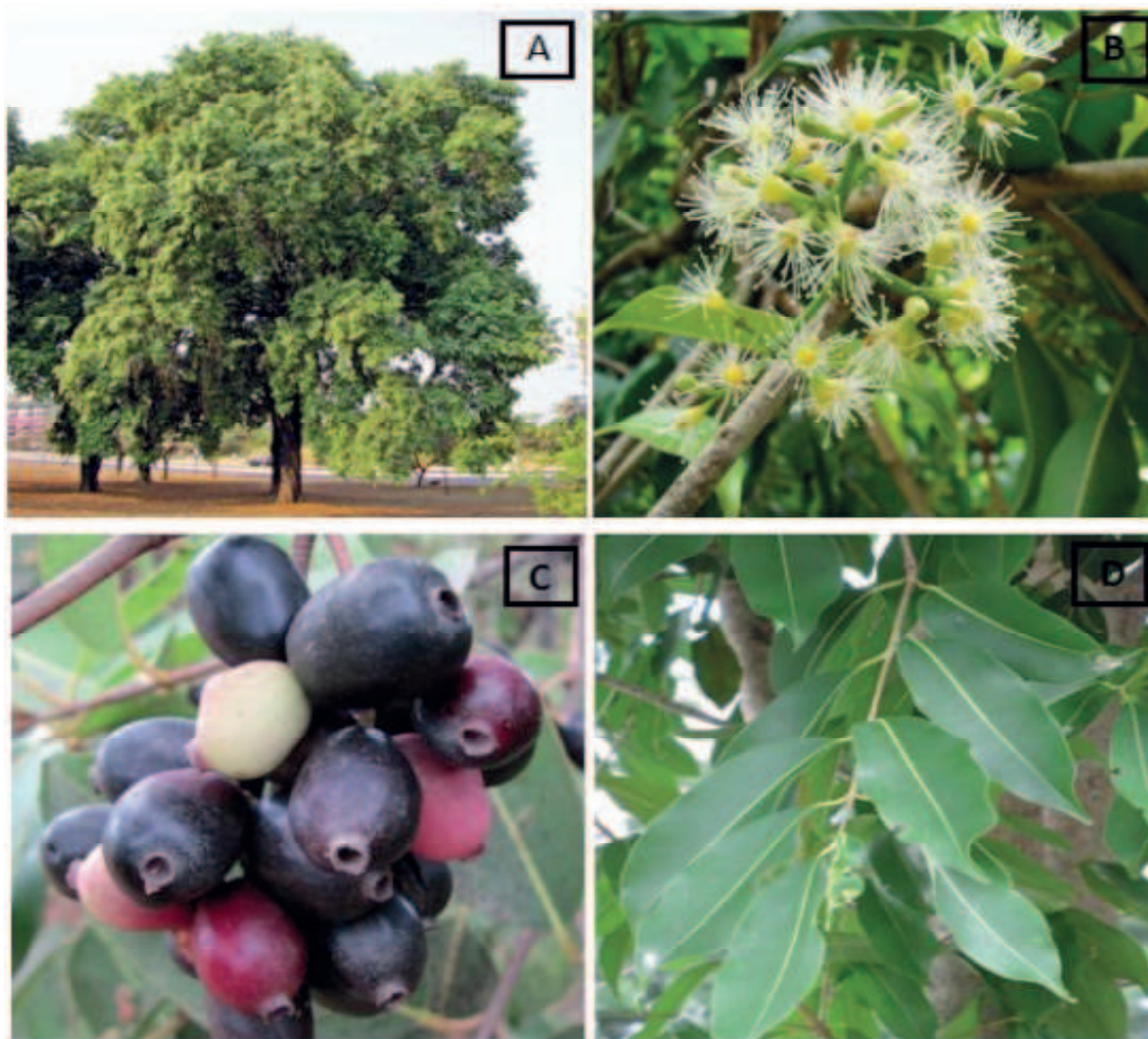


Figura 1- Visão geral da árvore de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, com detalhes para as flores, frutos e folhas.

(Imagens A, B e C: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Syzygium+cumini>; Imagem D: http://s262.photobucket.com/user/7_Heads/media/Fruit%20Trees/Syzygium_cumini_00.jpg.html)

Partes dessa planta como sementes, folhas, casca e frutos apresentam relatos de indicação e utilização na medicina popular para diversas finalidades terapêuticas, demonstrando diferentes ações farmacológicas (MIGLIATO et al, 2006; MIGLIATO et al, 2007; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012; BALIGA et al, 2013; CHAGAS et al, 2015).

Assim, em virtude da potencial atividade farmacológica atribuída a essa planta, pesquisas destinadas à investigação e identificação fitoquímica dos constituintes presentes nas diferentes estruturas anatômicas, evidenciaram a presença de substâncias pertencentes a diferentes classes de compostos fitoquímicos como alcaloides, compostos fenólicos, esteroides, flavonoides, glicosídeos, taninos, terpenoides e saponinas isolados a partir de diferentes regiões anatômicas da planta. Assim, a presença desses compostos bioativos sinalizam para a possibilidade de atribuir um potencial valor terapêutico promissor para essa planta, cujas propriedades medicinais poderiam ser atribuídas às diferentes ações biológicas exercidas por esses compostos, conforme dados da literatura (MIGLIATO et al, 2006; GOWRI; VASANTHA, 2010; BALIGA et al, 2013; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012; MOHAMED et al, 2013; CARTAXO--FURTADO et al, 2015; CHAGAS et al, 2015; PEREIRA et al, 2016). O Quadro 1 exemplifica algumas atividades biológicas atribuídas a alguns grupos de compostos fitoquímicos presentes em extratos vegetais.

Quadro 1- Algumas atividades biológicas e respectivos compostos fitoquímicos responsáveis por tais ações.

ATIVIDADE BIOLÓGICA	COMPOSTOS FITOQUÍMICOS ASSOCIADOS A ATIVIDADE	REFERÊNCIAS
Anti-inflamatória	Compostos fenólicos	SOOB RATTEE et al, 2005 CARTAXO-FURTADO et al, 2015
	Flavonoides	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009
	Saponinas	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009 GOWRI, VASANTHA, 2010
Antimicrobiana	Compostos fenólicos	SOOB RATTEE et al, 2005 HARSHA, ANILAKUMAR, 2014 CARTAXO-FURTADO et al., 2015
	Esteroides	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009 GOWRI; VASANTHA, 2010
	Flavonoides	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009 CARTAXO-FURTADO et al, 2015
	Taninos	AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009 GOWRI, VASANTHA, 2010 CARTAXO-FURTADO et al, 2015
Antioxidante	Compostos	BAJPAI et al, 2005 SOOB RATTEE et al, 2005

	fenólicos	GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2010 RENGASAMY et al, 2012 MOHAMED et al, 2013 HARSHA, ANILAKUMAR, 2014
	Flavonoides	RAVI et al, 2004 GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2010 MOHAMED et al, 2013 HARSHA, ANILAKUMAR, 2014
	Saponinas	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009 GOWRI, VASANTHA, 2010
Efeitos anticarcinogênicos	Flavonoides e taninos	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009 GOWRI, VASANTHA, 2010
Antifúngica	Compostos fenólicos	EVENSEN, BRAUN, 2009
	Flavonoides	PEREIRA et al, 2016
	Saponinas	AIYELAAGBE, OSAMUDIAMEN, 2009 GOWRI, VASANTHA, 2010 COLEMAN et al, 2010 PEREIRA et al, 2016

Desse modo, como mencionado anteriormente, a presença de determinados compostos fitoquímicos nas diferentes estruturas anatômicas de *S. cumini* pode sugerir a possibilidade da existência de um potencial terapêutico promissor para essa planta, podendo-se, portanto, apontar a necessidade da realização de investigações acerca das atividades biológicas associadas ao extrato das folhas desse vegetal.

Especificamente em relação as propriedades medicinais de *S. cumini* com interesse e/ou aplicação para a Odontologia, pode-se mencionar relatos da utilização de diferentes estruturas anatômicas dessa planta para obtenção de algumas finalidades terapêuticas, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Utilização terapêutica de diferentes partes da estrutura anatômica de *Syzygium cumini* (L.) Skeel com interesse e aplicabilidade na Odontologia.

ESTRUTURA ANATÔMICA	MODO DE UTILIZAÇÃO	FINALIDADE TERAPÊUTICA	REFERÊNCIAS
Casca		Antisséptico, adstringente em ulcerações bucais e estomatite	MIGLIATO et al, 2006

	Enxaguatório bucal a partir da decocção	Tratamento de ulcerações aftosas recorrentes, estomatites e afecções que acometem a garganta	LOGUERCIO et al, 2005
Folhas	Enxaguatório bucal	Tratamento de ulcerações aftosas recorrentes, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais	COSTA et al, 2009
Fruto	Gargarejos	Tratamento de irritações da garganta	MIGLIATO et al, 2006
Semente	Extrato	Tratamento de erupções da boca e garganta	CHANDRASEKARAN, VENKATESALU, 2004

Legenda: *** Não especificado

Além das aplicabilidades clínicas relatadas e de interesse para a Odontologia, estudos tem evidenciado a presença de atividade antimicrobiana para extratos de diferentes regiões anatômicas de *S. cumini*. Essa atividade inclui aquelas de natureza antibacteriana e antifúngica contra micro-organismos, tendo, portanto, interesse para a Odontologia, conforme descrito nos Quadros 3 e 4 a seguir.

Quadro 3 - Evidências de estudos demonstrando atividade antibacteriana de extratos de diferentes regiões anatômicas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel sobre micro-organismos de interesse para a Odontologia.

ESTRUTURA ANATÔMICA	MICRO-ORGANISMOS	REFERÊNCIAS
Folhas	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus parasanguis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	VIERA et al, 2012
	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	LOGUERCIO et al, 2005 OLIVEIRA et al, 2007 GOWRI, VASANTHA, 2010 MOHAMED et al, 2013
	<i>Enterococcus faecalis</i>	OLIVEIRA et al, 2007 MOHAMED et al, 2013

	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	OLIVEIRA et al, 2007 MOHAMED et al, 2013
	<i>Bacillus subtilis</i>	GOWRI, VASANTHA, 2010 MOHAMED et al, 2013
	<i>Staphylococcus intermedius</i> ,	LOGUÉRCIO et al, 2005
Casca do caule	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus oralis</i>	CARTAXO-FURTADO et al, 2015
Sementes	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>	CHANDRASEKARAN, VENKATESALU, 2004

Quadro 4. Evidências de estudos demonstrando atividade antifúngica de extratos de diferentes regiões anatômicas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre o gênero *Candida*.

ESTRUTURA ANATÔMICA	MICRO-ORGANISMOS	REFERÊNCIAS
Folhas	<i>Candida albicans</i>	COSTA et al, 2009 OLIVEIRA et al, 2007 PEREIRA et al, 2016
	<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i>	COSTA et al, 2009
	<i>Candida krusei</i>	OLIVEIRA et al, 2007
Casca do caule	<i>Candida albicans</i>	CARTAXO-FURTADO et al, 2015
Sementes	<i>Candida albicans</i>	CHANDRASEKARAN, VENKATESALU, 2004 HÖFLING et al, 2010
	<i>Candida dubliniensis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida lusitanae</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida rugosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida utilis</i>	HÖFLING et al, 2010

Desse modo, em virtude dos fatos expressos acerca da presença de determinados compostos fitoquímicos e dos relatos da existência de atividade antimicrobiana a partir de extratos de diferentes estruturas anatômicas do *S. cumini*,

sugere-se um potencial terapêutico promissor para essa planta, com diferentes aplicabilidades terapêuticas, dentre elas, ação antifúngica, a qual pode estar presente nas folhas desse vegetal.

Nesse aspecto, tomando por base as evidências disponíveis exemplificadas nos quadros anteriores, e levando-se em consideração a importância e relevância clínica que os fungos do gênero *Candida* apresentam na patogenia de infecções de interesse para a prática clínica odontológica (FREIRES et al, 2014), torna-se necessária a realização de estudos adicionais voltados para a investigação da atividade antifúngica, além de análises acerca da bioprospeção dos possíveis efeitos citotóxicos e antioxidantes associados ao extrato das folhas de *Syzygium cumini*.

2.5 Estudos de citotoxicidade de plantas medicinais

Durante a realização de estudos com substâncias provenientes de plantas medicinais e/ ou seus extratos, além de comprovar a existência de determinada atividade biológica, é necessário que sejam realizadas avaliações nas diferentes etapas do desenvolvimento da pesquisa destinadas a investigar parâmetros que possam fornecer informações que comprovem a eficácia e segurança de seu uso (NOLDIN et al, 2003; VARANDA, 2006; MIGLIATO et al, 2007).

Essas investigações são primordiais, já que as plantas produzem uma quantidade variável de substâncias químicas que, além de serem responsáveis pela atribuição de determinadas atividades biológicas, podem causar também reações patológicas variáveis, dentre as quais abrangem-se desde efeitos tóxicos, até aquelas capazes de culminar com a morte (CAMPOS et al, 2016).

Assim, destaca-se a importância e necessidade de identificar e caracterizar potenciais efeitos nocivos que possam vir a ser causados em decorrência da utilização desses produtos. Dentre os quais, pode-se citar aqueles de investigação dos efeitos toxicológicos e efeitos genotóxicos (WACZUK et al, 2015; CAMPOS et al, 2016).

Essas investigações fornecem informações preditivas acerca da segurança e fornecem parâmetros relacionados ao controle de qualidade e garantia quanto ao

uso das substâncias presentes na composição dos produtos vegetais. Desse modo, podem vir a assegurar ou não a possibilidade para sua indicação de uso, bem como da formulação de medicamentos e utilização terapêutica (NOLDIN et al, 2003; VARANDA, 2006; MIGLIATO et al, 2007; WACZUK et al, 2015).

Dentre os testes *in vitro* de avaliação toxicológica comumente realizados nos testes de bioprospecção de plantas com potencial medicinal pode-se incluir ensaios de citotoxicidade em eritrócitos humanos, destinados à investigação e avaliação de aspectos como atividade hemolítica (SHARMA; SHARMA, 2001; BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004; BRANDÃO et al, 2005; LUIZE et al, 2005; ; REDDY et al, 2007; HE et al, 2009; OLIVEIRA et al, 2009; PINTO et al, 2012; MUKHERJEE; RAJASEKARAN, 2010; KUMAR et al, 2011; ABBASI et al, 2013; TUPE et al, 2015; MEHREEN et al, 2016), avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária, também conhecida como atividade anti-hemolítica (REDDY et al, 2007; HE et al, 2009; CHIKEZIE et al, 2012; WACZUK et al, 2015; DUARTE et al, 2016), além também de investigações acerca de sua possível atividade antioxidante (BUKOWSKA, KOWALSKA, 2004; REDDY et al, 2007; ARBOS et al 2008; HE et al, 2009; CHIKEZIE et al, 2012), os quais serão comentados a seguir.

2.5.1 Avaliação do potencial hemolítico de plantas medicinais e /ou seus extratos

Diferentes substâncias, inclusive aquelas provenientes de plantas medicinais e/ou seus extratos, ao serem utilizadas em organismos vivos podem interagir com os componentes biológicos como células e componentes celulares, causando efeitos biológicos de diversos tipos, dentre eles, aqueles de natureza citotóxica (BRANDÃO et al, 2005).

Dentre os possíveis efeitos deletérios celulares, pode-se mencionar a ocorrência de reações que podem levar à peroxidação lipídica e oxidação de proteínas causando danos sobre lipídios e proteínas presentes na membrana celular. Assim, essas reações configuram-se potencialmente danosas à viabilidade celular, uma vez que levam à indução da ocorrência de desequilíbrios osmóticos na membrana celular, que pode consequentemente culminar com a ruptura da mesma, levando à lise celular (VISSERS et al, 1998; REDDY et al, 2007).

Nesses casos, durante a avaliação dos efeitos citotóxicos de substâncias, estudos *in vitro* empregando modelos celulares como eritrócitos humanos têm sido utilizados visando investigar e avaliar a capacidade das substâncias exercerem ou não efeitos citotóxicos através da indução de hemólise (BRANDÃO et al, 2005; PINTO et al, 2012; BRASIL, 2012; VO et al, 2016).

A utilização desses modelos celulares para tal avaliação pode ser atribuída em virtude do fato de a membrana celular ser um componente com um caráter dinâmico e ao mesmo tempo sensível, com capacidade de sofrer mudanças significativas quando expostos à ação de substâncias tóxicas exógenas (SHARMA; SHARMA, 2001).

Nesses casos, frente à exposição dos eritrócitos a uma dada substância, a observação de efeitos citotóxicos constitui um reflexo da ocorrência de reações deletérias, as quais podem ocorrer em virtude de um conjunto de perturbações celulares que podem manifestar-se através da indução da formação de poros na membrana celular, provocando a desestabilização da mesma, e conseqüentemente sua ruptura, levando assim à hemólise (ARBOS et al, 2008; VO et al, 2016). Assim, a constatação de danos celulares com a indução de hemólise constitui um indício que reflete o caráter citotóxico de uma substância perante a membrana celular eritrocitária (SHARMA; SHARMA, 2001). Desse modo, a verificação de hemólise a partir da exposição dos eritrócitos a uma substância química indica que a mesma é capaz de exercer ação hemolítica, ao passo que a ausência desse efeito sugere que a substância avaliada não exerce toxicidade a nível da membrana celular de eritrócitos (OLIVEIRA et al, 2009).

Esse ensaio tem sido incluído dentre os testes de avaliação e triagem dos efeitos biológicos causados por substâncias, especificamente para a investigação e avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos que possam causar. Assim, constitui um importante indício que reflete a capacidade das substâncias de exercerem ou não efeitos citotóxicos (BUKOWSKA, KOWALSKA, 2004; APARICIO et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2009; MUKHERJEE; RAJASEKARAN, 2010; PINTO et al, 2012).

Assim, vem sendo indicadas e utilizadas como um modelo de avaliação toxicológica preliminar *in vitro*, sobretudo para as substâncias com potencial interesse farmacológico com indicação e uso terapêutico ou cosmético. Desse modo, são incluídos entre os ensaios preliminares a serem realizados com tais

substâncias, dada a simplicidade de realização e sua capacidade de permitir avaliar e prever a ocorrência ou não de efeitos citotóxicos decorrentes da utilização das mesmas (PINTO et al, 2012; BRASIL, 2012; VO et al, 2016).

2.5.2 Avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária frente à exposição a plantas medicinais e /ou seus extratos

A integridade da membrana celular dos eritrócitos frente à ação de determinadas substâncias constitui um bom indicador para avaliação dos efeitos biológicos induzidos por essas substâncias, destacando sua importância nos testes de avaliação de citotoxicidade *in vitro* (SHARMA; SHARMA, 2001).

Assim, na triagem e avaliação de substâncias sobre eritrócitos, além da investigação de efeitos citotóxicos através do teste de atividade hemolítica, é necessário também investigar se a mesma apresenta potencial efeito anti-hemolítico, no sentido de prever se a mesma é capaz de exercer ou não papel protetor frente a uma situação de hemólise induzida (HE et al, 2009; WACZUK et al, 2015).

Essa análise da estabilidade da membrana dos eritrócitos frente à ação de determinadas substâncias constitui um critério importante para a avaliação do comportamento funcional e da estabilidade dessa estrutura frente à exposição a tais compostos (CHIKEZIE et al, 2012). De modo geral, pode ser simulada *in vitro* através da exposição celular às condições osmóticas adversas capazes de oferecer um potencial perigo para a viabilidade celular mediante a indução de alterações na integridade da membrana celular, aumentando sua fragilidade (HE et al, 2009), de modo que fornece indícios marcadores da sensibilidade celular frente às mudanças osmóticas potencialmente danosas à viabilidade celular (REDDY et al, 2007).

Sua análise baseia-se na observação dos efeitos hemolíticos produzidos por uma condição de desafio osmótico capaz de provocar lise celular e a comparação com aqueles observados pela exposição celular nas mesmas condições e associado a uma substância teste para a qual esteja sendo investigada a capacidade de atuar revertendo e/ou atenuando esses efeitos citotóxicos (CHIKEZIE et al, 2012). Assim, nesse teste busca-se investigar os possíveis efeitos protetores ou indutores do

composto teste frente a alterações da membrana celular exposta à condições osmóticas adversas (CHIKEZIE et al, 2012; DUARTE et al, 2016).

A investigação dos efeitos citotóxicos através do teste de fragilidade osmótica eritrocitária tem seu emprego consolidado nas investigações dos efeitos biológicos das substâncias, fornecendo indícios de evidência da ação toxicológica *in vitro* causada por determinada substância sobre eritrócitos (REDDY et al, 2007; CHIKEZIE et al, 2012; DUARTE et al, 2016), constituindo, portanto, um parâmetro importante durante a avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos de substâncias como plantas medicinais e/ou extratos (WACZUK et al, 2015).

2.5.3 Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, dano oxidativo e o papel de substâncias antioxidantes endógenas e exógenas na regulação desses efeitos

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são substâncias produzidas a partir do metabolismo celular e incluem compostos reativos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres, como oxigênio singleto (1O_2), íon superóxido (O_2^-), íons hidroxila (OH^-). Essas substâncias apresentam um caráter tóxico, além de possuir alta capacidade reativa junto a estruturas e componentes celulares como membrana celular, proteínas, enzimas e material genético (HALLIWELL, 1997; BJAPAI et al, 2005; HARSHA; ANILAKUMAR, 2014; MOHAMED et al, 2013).

O acúmulo de radicais livre é decorrente de uma alta produção de EROs, ou de um contrabalanço entre sua produção e degradação (HALLIWELL, 1997), podendo causar o aumento progressivo de injúrias através da oxidação de biomoléculas, podendo levar à ocorrência de lesão celular (HALLIWELL, 1997; BJAPAI et al, 2005; SOUZA et al, 2007; ALVES et al, 2010; HARSHA, ANILAKUMAR, 2014; MOHAMED et al, 2013), através da instalação inicial de um estresse oxidativo, que pode evoluir progressivamente para um estado de dano oxidativo (HALLIWELL, 1997).

O organismo é capaz de reverter ou combater os efeitos gerados pelos radicais livres produzidos durante o processo metabólico através da ação de mecanismos antioxidantes enzimáticos, mediante a produção de enzimas com ação antioxidante capazes de reverter e/ou prevenir os efeitos biológicos danosos

decorrentes das reações e processos oxidativos (HALLIWELL, 1997; RAVI et al, 2004; ALVES et al, 2010). No entanto, em determinados casos, a ação do mecanismo antioxidante endógeno pode ser insuficiente para combater os efeitos oxidativos produzidos pelo organismo, sendo necessária a suplementação adicional de substâncias antioxidantes a partir de fontes exógenas (ALVES et al, 2010).

Desse modo, dada a capacidade de prevenir e/ou reverter reações oxidativas de biomoléculas bem como a ocorrência de estresse e dano oxidativos (McCORD, 2000; ALVES et al, 2010), a indicação da utilização de substâncias antioxidantes a partir de suplementação exógena pode ser considerada como uma ferramenta auxiliar e importante para a manutenção da viabilidade celular e consequentemente da saúde e bem-estar (HARSHA, ANILAKUMAR, 2014).

2.5.4 Avaliação do potencial antioxidante de plantas medicinais e /ou seus extratos

A necessidade de investigações direcionadas à busca de novas fontes de substâncias com atividade antioxidante visando somá-las ao leque dos compostos antioxidantes já conhecidas e disponíveis tem se tornado evidente. Nesse aspecto, atenção especial tem sido direcionada sobretudo para as substâncias provenientes de origem “natural”, como as plantas medicinais e/ ou extratos (ALVES et al, 2010; MOHAMED et al, 2013).

Efeitos antioxidantes de compostos bioativos tem sido relacionados através de sua atuação por meio de mecanismos como a eliminação de radicais livres, participação em processos quelantes e processos de redução, bem como por meio de efeitos protetores sobre enzimas antioxidantes (DORNAS et al, 2007; RAVI et al, 2004; MOHAMED et al, 2010; HARSHA; ANILAKUMAR, 2014).

Determinados grupos de substâncias presentes na composição química de plantas medicinais e/ou extratos como flavonoides, compostos fenólicos, saponinas e taninos exercem ação antioxidante, de modo que plantas medicinais e/ou extratos que possuam tais compostos em sua composição têm sido alvo de investigação visando avaliar potenciais propriedades antioxidantes (SALAH et al, 1995; BAJPAI et al, 2005; DORNAS et al, 2007; AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009; GOWRI;

VASANTHA, 2010; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; PEREIRA, CARDOSO, 2012; MOHAMED et al, 2013; SHRIKANTA et al, 2015).

Assim, visto que a presença desses constituintes fitoquímicos pode sinalizar a existência de ação antioxidante para a mesma, a avaliação dessa atividade permite que se possa investigar e atribuir ou não a existência de propriedades antioxidantes para as espécies vegetais (HARSHA; ANILAKUMAR, 2014; MOHAMED et al, 2013).

Nesse sentido, a investigação e avaliação da capacidade antioxidante de plantas medicinais e/ou extrato tem sido realizada através de testes *in vitro* utilizando modelos celulares como eritrócitos (ARBOS et al, 2008), uma vez que essas células apresentam um sistema antioxidante característico que permite que reajam com radicais livres e sejam capazes de reverter até certo ponto as reações intracelulares oxidativas potencialmente danosas (ARBOS et al 2008; PINTO et al, 2012).

Quando uma substância apresenta atividade oxidante, há a indução de um estresse oxidativo provocado a partir de reações oxidativas em estruturas e componentes celulares (VISSERS et al, 1998; REDDY et al, 2007), sendo que, no caso dos eritrócitos, esses danos podem ocorrer na molécula de hemoglobina (Hb). Desse modo, a investigação dos efeitos antioxidantes de uma substância teste pode ser feita através da avaliação das injúrias causadas sobre essa molécula (ARBOS et al, 2008).

Nesse caso, a ocorrência dos efeitos oxidativos sobre essa molécula é capaz de levar à transformação do estado reduzido de Hb para o estado oxidado de metahemoglobina (mHb), o qual quando em formação excessiva é capaz de induzir e perpetuar cada vez mais a ocorrência das reações de desnaturação celular oxidativa (ARBOS et al, 2008).

Desse modo, a avaliação da atividade antioxidante pode ser simulada por meio da realização de testes *in vitro* com eritrócitos expostos à substâncias capazes de causar a oxidação da Hb à mHb, de modo que a capacidade antioxidante da substância sob investigação será evidenciada quando a mesma for capaz de produzir uma redução na formação de mHb dos eritócitos (ARBOS et al, 2008), sendo empregados de forma eficaz para a avaliação de uma dada substância quanto à possibilidade de exercer efeito protetor ou indutor de reações oxidativas (ARBOS et al, 2008; PINTO et al, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels sobre cepas do gênero *Candida*, bem como investigar o efeito citotóxico e antioxidante.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os compostos químicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre cepas de referência e isolados clínicos de fungos do gênero *Candida*;
- Determinar a ação do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* sobre a cinética de crescimento de cepa de referência de *C. albicans*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de folhas de *S. cumini* sobre eritrócitos humanos utilizando os testes de hemólise e fragilidade osmótica eritrocitária;
- Investigar o perfil oxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de *S. cumini* e sua atividade antioxidante na presença de espécies reativas de oxigênio e de fenilhidrazina.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

O estudo foi realizado a partir de ensaios laboratoriais experimentais *in vitro*.

4.2 Local da pesquisa

As análises fitoquímicas foram realizados no Laboratório de Análises Química e Ambiental (LAQUISA), do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande-PB.

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Análises e Diagnóstico, localizado no Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande-PB.

Os testes de avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa-PB.

As análises foram realizadas entre os períodos de Agosto a Dezembro de 2016 e Março a Maio de 2017.

4.3 Material botânico e processamento vegetal

O material botânico utilizado no estudo foram folhas *Syzygium cumini*. Estas foram coletadas no mês de Abril de 2015, na Chácara Flor do Campo, localizada na zona rural do município de Campina Grande-PB (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W), nordeste do Brasil.

O espécime de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, onde encontra-se identificado com o número de voucher: JPB 58.543.

Após a coleta do material botânico, as folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram limpas e submetidas à secagem e desidratação em estufa com circulação de

ar (FANEM – Modelo 330/5), a temperatura de 45°C até a estabilização final do peso. Posteriormente, foram processadas em moinho de facas (Solab Científica) de 10 mesh.

O material vegetal utilizado consistiu no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini*. O método de extração utilizado para obtenção do mesmo foi a percolação. Após extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura média de 45°C, obtendo-se o extrato bruto.

A proporção utilizada foi de 200 g do material vegetal moído para 1000 mL de solução etanólica a 70%. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM) do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

Posteriormente, o extrato foi submetido ao processo de liofilização (LS 3000 Terroni®). Esse procedimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises, localizado na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

Assim, o material vegetal utilizado nos testes consistiu no extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas *Syzygium cumini*.

4.4 Análise fitoquímica

4.4.1 Método de extração das amostras

Foram utilizados dois métodos para extrair as substâncias do extrato liofilizado das folhas de *Syzygium cumini*: Extração Líquido-Líquido e Extração em Fase Sólida.

Inicialmente pesou-se 0,0125 mg do extrato liofilizado e em seguida dissolveu-se o mesmo em 2,5 mL de uma solução de álcool a uma concentração de 40 %. Logo após, o extrato dissolvido foi diluído em água ultrapura para obtenção de uma alíquota de 30 mL da amostra. Em seguida, a amostra foi filtrada em membrana de 0,45 µm para remover partículas suspensas (RIGOBELLO et al, 2015).

4.4.2 Extração Líquido-Líquido

Em um funil de separação foi adicionado 30 mL do extrato dissolvido a um pH= 7,0, onde foi adicionado 10 g de NaCl.

Em seguida iniciou-se a extração dos compostos orgânicos presentes no extrato adicionando-se 100 mL de acetato de etila ao funil de separação. O funil foi selado e agitado por 2,0 min, aliviando-se periodicamente a pressão para a liberação do vapor dos solventes.

A mistura foi deixada em repouso por 30 min para assegurar a separação das fases aquosas e orgânica.

Após esse período foi feita a separação entre o extrato e o acetato de etila, sendo a fase orgânica transferida para um béquer e a fase aquosa descartada. Em seguida, a fase orgânica foi seca adicionando-se 20 g de NaSO₄ anidro e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose com tamanho dos poros de 0,45 µm, sendo transferido para outro béquer. Em seguida, a fase orgânica extraída foi colocada em um dessecador até ser reduzido para um volume de 3 mL (RIGOBELLO et al, 2015).

4.4.3 Método cromatográfico

A identificação dos compostos orgânicos presentes no extrato das folhas de *Syzygium cumini* foi realizado em um Cromatógrafo Gasoso (Thermo Scientific TRACE 1300) acoplado a um Espectrômetro de Massas com analisador quadrupolos (Thermo Scientific ISQ-QD).

A separação cromatográfica foi feita dois tipos de colunas: uma coluna capilar HP-5MS de sílica fundida (30m x 0,25mm x 0,50µm) da Varian Technologies (EZ-Guard Columns) e uma coluna SPB – 624 (30m x 0,25mm x 0,50µm).

A programação de temperatura de forno do cromatógrafo gasoso foi semelhante para as duas colunas utilizadas: 40°C mantido por 2,0 min, 5°C/min até 70°C mantido por 10 min e 10°C/min até 200°C por um tempo de 30 min, respectivamente.

O gás de arraste utilizado foi o Hélio com uma vazão de 1 mL min⁻¹. A temperatura do injetor utilizada foi de 250°C no modo *splitless* para uma razão de 33,3.

O volume do material injetado foi de 1µL e a detecção foi realizada por um detector seletivo de massas equipado com uma fonte de impacto de elétrons a 70 eV.

A aquisição de dados foram obtidas no modo *full scan*. A temperatura da fonte de íons e da linha de transferência do Espectrômetro de Massas foram, respectivamente, 250°C e 275°C. A faixa de varredura de *m/z* foi de 50 a 650 com um tempo de corte do solvente igual a 5 min.

Os espectros de massa foram comprados com os compostos de referência da biblioteca NIST.

4.5 Micro-organismos envolvidos e preparo do inóculo

Os micro-organismos utilizados no presente estudo foram cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ e estocadas em amostras no Laboratório de Análises e Diagnóstico, do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

Além disso, utilizou-se-se cepas clínicas de *Candida albicans* (LM1) e *Candida albicans* (LM3) fornecidas pelo Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde (Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB), onde foram isoladas e identificadas previamente. Essas cepas também encontram-se estocadas em amostras no Laboratório de Análises e Diagnóstico, do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

O preparo do inóculo para a realização dos testes de suscetibilidade foram feitos seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras, com modificações (CLSI, 2008). Os inóculos fúngicos foram padronizados em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil), utilizando-se o comprimento de onda de 530nm e absorbância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de 5 x 10⁶ UFC/mL.

As análises foram realizadas após diluições sucessivas dos inóculos, de modo a obter amostras na concentração final de 5×10^3 UFC/mL, sendo que durante a realização dos testes de atividade antimicrobiana, nos poços das microplacas, esta caiu pela metade, resultando em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

4.6 Reativação dos micro-organismos

As cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), e as cepas clínicas de *Candida albicans* (LM1) e *Candida albicans* (LM3) foram reativadas em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C, por 24 h.

Após isso o conjunto foi centrifugado e as células suspensas em 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, a concentração de células foi determinada com auxílio de espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil), utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm. A densidade celular foi estabelecida na absorbância entre 0,08–0,1, equivalente a concentração de 5×10^6 UFC/mL (CLSI, 2008).

4.7 Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica do extrato das folhas de *S. cumini* foi determinada seguindo-se, com modificações, as indicações da normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), realizado por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008).

A partir desta, foram obtidas os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato frente às cepas avaliadas.

Microplacas com 96 poços de fundo chato (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100 µL de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, 100 µL do extrato das folhas

de *S. cumini* (4000 µg/mL) foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca. Foram utilizados controles farmacológicos com Nistatina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) (256 µg/mL) e Fluconazol (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) (256 µg/mL) os quais foram realizados inserindo-se 100 µL dessas substâncias na primeira fileira de poços da microplaca.

Controle de viabilidade dos micro-organismos (ausência das substâncias antimicrobianas), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de micro-organismos) e controle do veículo (etanol a 40%), substância diluente do extrato, foram também realizados e avaliados para garantir acurácia do método.

Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fileira dos poços aos subsequentes. E em seguida, 100 µL da suspensão dos micro-organismos diluído em caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) foram inseridos em todos os poços, obtendo uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Desse modo, o extrato foi avaliado entre intervalos de concentrações de 1000 µg/mL a 7,8 µg/mL e os controles farmacológicos de Nistatina e Fluconazol foram avaliados em concentrações que variaram de 64 µg/mL a 0,5 µg/mL.

Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h em aerobiose. Após esse período, a CIM foi identificada e definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos micro-organismos avaliados. A viabilidade dos micro-organismos foi determinada através da utilização do corante resazurina (0,01%) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), pipetando-se 50 µL em todos os poços.

A metabolização do corante pelos micro-organismos viáveis resultou na conversão do pigmento de coloração azulada para coloração rosa. A CIM foi identificada e definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos micro-organismos avaliados (CLSI, 2008). Todos os procedimentos foram feitos em três experimentos independentes em triplicata (n=9), e os resultados expressos a partir da moda dos valores obtidos.

Em seguida, a CFM foi determinada a partir da semeadura, em placas de Petri preparadas com Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA), de alíquotas de 10 µL das amostras de todos os poços correspondentes a concentrações iguais

ou superiores a CIM. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A CFM foi considerada como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento dos sub-cultivos. Todos os procedimentos foram feitos em três experimentos independentes em triplicata (n=9), sendo os resultados expressos através da moda dos valores obtidos nos experimentos.

4.8 Efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida*

O efeito do extrato das folhas de *S. cumini* sobre a cinética do crescimento foi determinado pela curva de time-kill, segundo metodologia proposta por Cantón et al (2009), Klepser et al (1997) e De Castro et al (2013), com algumas modificações.

Utilizou-se nesse teste cepa de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231). O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do inóculo, e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos micro-organismos equivalentes a 5×10^3 UFC/mL.

Microplacas com 96 poços de fundo chato (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas, inserindo-se 100 µL de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 µL do extrato das folhas de *S. cumini* (4000 µg/mL). Para o controle farmacológico, usou-se Nistatina (256 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Controle de viabilidade dos micro-organismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de micro-organismos) e controle do veículo (diluyente do extrato) foram também realizados e avaliados para garantir acurácia do método.

Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fila de poços aos poços subsequentes. E em seguida, 100 µL da suspensão dos micro-organismos diluído em caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) foram inseridas em todos os poços, obtendo uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008).

Para esse teste, as concentrações avaliadas para o extrato corresponderam aquelas equivalentes a 500, 250 e 125µg/mL, correspondentes respectivamente à 4x CIM, 2x CIM e CIM. Para o controle farmacológico, a Nistatina foi avaliada nas concentrações de 16, 8 e 4µg/mL, correspondentes respectivamente aos valores 4x CIM, 2x CIM e CIM.

Realizou-se a semeadura de alíquotas de 10 µL em placas de Petri preparadas com Agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a 37° C por um período de 24h. Decorrido esse período, o número de micro-organismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para cada concentração e tempo de análise. Desse modo, por meio deste teste, pôde-se determinar o efeito das substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *Candida albicans* (ATCC 10231). Os experimentos foram feitos em triplicata (n=3), e os resultados foram expressos através da média das triplicatas.

4.9 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos

4.9.1 Material biológico

Os teste de citotoxicidade *in vitro* foram realizadas utilizando eritrócitos humanos dos tipos A, B, AB, O proveniente de bolsas de sangue obtidas na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB. O sangue obtido consistiu naquele que seria descartado, em virtude de não ser mais passível de utilização para finalidades transfusionais. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida unidade.

4.9.2 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Para a realização desse ensaio, uma amostra de sangue humano foi inicialmente misturada com NaCl 0,9% na proporção de 1:30. Em seguida essa

amostra foi centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção do concentrado de eritrócitos, repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Ao final, o sedimento da última centrifugação foi mais uma vez ressuspensão em NaCl 0,9%, obtendo-se uma suspensão de 0,5% de sangue.

As amostras de 0,5 mL do extrato das folhas de *S. cumini* em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) foram adicionadas em tubos contendo 2 mL da suspensão de eritrócitos obtidas conforme descrito anteriormente. Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação lenta e constante (100 rpm) e decorrido este tempo foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min, e a hemólise das amostras quantificada por espectrofotometria, através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) a um comprimento de onda de 540nm.

Uma suspensão dos eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise) e uma suspensão dos eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% foi utilizada como controle positivo (100% de hemólise) (RANGEL et al, 1997).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$), e os resultados foram expressos através da média $\pm$ erro padrão da média.

4.9.3 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

As amostras de 0,5 mL do extrato das folhas de *Syzygium cumini* em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) foram adicionadas em tubos contendo 2 mL de uma solução de eritrócitos a 0,5% (obtidas conforme descrito anteriormente), e incubados por 1 hora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante.

O sedimento de eritrócitos foi ressuspensão em uma solução hipotônica de NaCl 0,24% e agitados a 100 rpm por 20 minutos, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Após isto, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, sendo a hemólise quantificada por meio da leitura das absorbâncias de uma alíquota do sobrenadante, através de espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil), em um comprimento de onda de 540nm (DACIE, 2001).

Uma solução de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise), enquanto que o controle positivo (100% de hemólise) consistiu em uma solução de eritrócitos adicionados a solução de NaCl 0,24%.

Os resultados foram expressos em percentual de hemólise em comparação ao grupo controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), sendo os resultados expressos através da média $\pm$ erro padrão da média.

4.9.4 Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de espécies reativas de oxigênio

O experimento foi realizado de acordo com metodologia proposta por Bilotto et al (2012), com algumas modificações.

Amostras do extrato das folhas de *Syzygium cumini* em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados em tubos contendo 2 mL de uma solução de eritrócitos a 0,5 % (obtida conforme descrito anteriormente), com adição de uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (40 mM). Os tubos foram incubados por 4 h a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada através da leitura de uma alíquota do sobrenadante em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) a um comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al, 1997).

Amostras contendo solução de eritrócitos foram utilizadas como controle negativo. Por outro lado, o controle positivo correspondeu a solução de eritrócitos associados a solução de H_2O_2 40 mM (100% de hemólise). Foi também utilizado um padrão contendo Hemoglobina (Hb) + H_2O_2 + Vitamina C (1000 $\mu\text{g/mL}$).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos através do percentual de hemólise em comparação ao grupo controle positivo.

4.9.5 Avaliação do potencial oxidante e do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

Para a investigação do potencial oxidante foi preparado inicialmente uma suspensão de eritrócitos a uma concentração de 30% em Tampão fosfato salino (PBS) (11,35g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36g Na_2HPO_4 e 7,18g NaCl para 1L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6.

Após a obtenção dessa suspensão, as amostras do extrato das folhas de *Syzygium cumini* nas diferentes concentrações testadas (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a tubos contendo 2 mL da suspensão de eritrócitos a 30% em Tampão fosfato salino conforme descrito acima.

As amostras foram incubados por um período de 1 h sob agitação lenta e constante (100 rpm) a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min e a porcentagem de metahemoglobina (mHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) em comprimentos de onda de 630nm e 540nm, respectivamente. A porcentagem de mHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina, agente oxidante utilizado como controle positivo (ARBOS et al, 2008).

Para o ensaio de investigação do potencial antioxidante, após o período de incubação de 1h referente a etapa descrita anteriormente, foi adicionado 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina, e em seguida as suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 20 minutos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5,7g KH_2PO_4 para 1L) e a porcentagem de mHb em relação a Hb total foi quantificada através da leitura em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) a 630 nm e 540 nm, respectivamente.

O percentual de mHb formado foi comparado com os valores obtidos para o grupo contendo vitamina C (20 mmol/L) agente anti-oxidante (ARBOS et al, 2008).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$), e os resultados foram expressos através do percentual de formação de metahemoglobina em função

da hemoglobina mHb (%Hb), em comparação ao grupo controle positivo (Hb + fenilhidrazina) (ARBOS et al, 2008).

4.10 Análise estatística

Os resultados do ensaio do efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida* foram analisados através do programa SPSS Statistics para Windows® versão 20.0, considerando-se o nível de significância de 5%. A comparação entre os produtos testados foram realizados dentro de cada tempo utilizando-se o teste de análise de variância a um fator fixo (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey.

Os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade utilizando-se eritrócitos humanos foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0® (San Diego, CA, EUA) empregando-se o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett. Os valores foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) ou desvio padrão da média (d.p.) e considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 ASPECTOS ÉTICOS

Uma vez que os testes envolveram a utilização de material biológico proveniente de seres humanos, os mesmos foram realizados de acordo com as diretrizes e normas da Resolução 466/2012 CNS.

Previamente à condução e realização dos experimentos, o Projeto de Pesquisa foi registrado na Plataforma Brasil, no site do Ministério da Saúde e submetido para avaliação e apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, onde recebeu parecer de aprovação (Anexo 1) sob o número CAAE: 62508416.8.0000.5187.

6 RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram divididos em dois artigos científicos, os quais serão apresentados a seguir:

ARTIGO 1

Periódico: Archives of Oral Biology

Fator de Impacto:1,733

Qualis Odontologia A2

Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico (Anexo B)

Análise química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e investigação do potencial antifúngico do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel

Ernani Canuto Figueirêdo Júnior^a; Yuri Wanderley Cavalcanti^b; Wilton Silva Lopes^c; Josivandro do Nascimento Silva^c; Jozinete Vieira Pereira^{*a}

^aPrograma de Pós-Graduação em Odontologia- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB

^bDepartamento de Clínica e Odontologia Social- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB

^cPrograma de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB

*Autor correspondente:

Jozinete Vieira Pereira Marques

Programa de Pós-Graduação em Odontologia- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB

Telefone: (83) 3315-3300

E-mail: jozinetevieira@hotmail.com

RESUMO:

OBJETIVO: O objetivo desse estudo foi analisar fitoquimicamente o extrato hidroalcoólico bruto de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel e investigar seu potencial antifúngico sobre espécies do gênero *Candida*. **METODOLOGIA:** As folhas de *S. cumini* (Myrtaceae) foram coletadas na região do semiárido paraibano, município de Campina Grande/PB, Brasil. O extrato foi obtido por meio do método de percolação e quimicamente caracterizado através de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa. A atividade antifúngica foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC 750) e cepas clínicas de *C. albicans* (LM1) e *C. albicans* (LM3), observou-se também nesse estudo, sua ação sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231). Os dados foram avaliados por meio do teste ANOVA seguido pelos pós-testes de Tukey, admitindo valor $\alpha=0,05$. **RESULTADOS:** No total 35 compostos foram identificados, sendo 2,2-Dimetoxibutano; 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-; 5-Hidroximetilfurfural; 2,4-Di-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furan-3-ona, Ácido propanodioico e dimetil éster as substâncias majoritárias presentes no extrato. O extrato demonstrou valores de CIM entre 31,25 e 125 µg/mL e CFM entre 250 e >1000 µg/mL, com efeito fungistático sobre as cepas testadas, sendo esse mais significativo por um período de oito horas de exposição à *C. albicans*. **CONCLUSÕES:** O extrato demonstrou potencial antifúngico promissor,

devendo ser melhor investigado em virtude de perspectivas futuras quanto indicação e utilização clínica como modalidade terapêutica antifúngica alternativa.

Palavras-chave: Candidíase oral; Agentes antifúngicos; Extratos de plantas; *Syzygium cumini*; Atividade antifúngica.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of this study was to analyze phytochemically the hydroalcoholic raw extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeel leaves and to investigate its antifungal potential on species of the *Candida* genre. **METHODOLOGY:** The *S. cumini* (Myrtaceae) leaves were collected in Campina Grande, in the semiarid region of Paraíba, Brazil. The extract was obtained by percolation and it was chemically characterized through gas chromatography combined with mass spectrometry. The antifungal activity was determined through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) over *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC 750) and *C. albicans* (LM1) and *C. albicans* (LM3) clinical strains. We also observed the antifungal action over the *C. albicans* (ATCC 10231) growth kinetics. The data were evaluated by the ANOVA test and by the Tukey post-tests, considering the value $\alpha=0,05$. **Results:** A total of 35 compounds were identified, knowing that 2,2-Dimethoxybutane; 4H-Pyran-4-one,2,3-di-hydro-3,5-di-hydroxy-6-methyl-; 5-Hydroxymethylfurfural; 2,4-Di-hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H) -furan-3-one, propanedioic acid and dimethyl ester were the main substances found in the extract. The extract showed MIC values among 31,25 and 125 $\mu\text{g/mL}$ and MFC among 250 and >1000 $\mu\text{g/mL}$, with fungistatic effect over the tested strains, mainly after they were exposed to the *C. albicans* for an eight hours period. **CONCLUSIONS:** The extract showed a promising antifungal potential, therefore, it should be better analyzed in order to discover its indication and clinical use as an alternative antifungal therapeutic modality.

Key words: Oral candidiasis; Antifungal agents; Plants extracts; *Syzygium cumini*; Antifungal activity.

INTRODUÇÃO

A candidose é uma infecção que tem como agente etiológico os fungos do gênero *Candida* (THEIN et al, 2006; PELEG et al, 2010; ZOMORODIAN et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011). Essa condição pode manifestar-se clinicamente desde uma infecção superficial, até formas mais graves e de intensidade variável, podendo causar comprometimento sistêmico (THEIN et al, 2006). Nesse contexto, sendo considerada um problema de saúde pública com elevada prevalência e morbidade. Algumas das suas causas estão relacionados à imunossupressão (ALVES et al, 2014; GULATI; NOBILE, 2016; SILVA et al, 2011);

uso de antibióticos de largo espectro; higiene bucal deficiente e uso de dispositivos protéticos (THEIN et al, 2009; PELEG et al, 2010; GOW et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011; SILVA-ROCHA et al, 2015), sendo esses últimos, de interesse na prática clínica odontológica.

Candida albicans é a espécie mais prevalente nessas infecções, embora a mesma também esteja associada a outras espécies fúngicas (PELEG et al, 2010; ZOMORODIAN et al, 2011; BENSADOUN et al, 2011; WILLIAMS et al, 2011) e bacterianas de forma comensal e formando biofilmes mistos (THEIN et al, 2006). Nesses casos, além da *Candida albicans* as espécies mais encontradas são *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (MARTINS et al, 2016).

A ocorrência de patógenos resistentes e a toxicidade causada por alguns antifúngicos, sinaliza a necessidade para a realização de investigações voltadas à descoberta de novas possibilidades terapêuticas direcionadas contra infecções causadas por fungos do gênero *Candida* (FENNER et al, 2006; COSTA et al, 2009; COLEMAN et al, 2010; PEREIRA et al, 2016), incluindo-se aquelas envolvendo plantas medicinais e/ ou seus extratos, já que essas podem fornecer resultados terapêuticos promissores para o tratamento de afecções fúngicas como a candidose (COSTA et al, 2009).

Nessa perspectiva, destaca-se o *Syzygium cumini* (L.) Skeels, pertencente à família Myrtaceae, e conhecida popularmente como jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva (MIGLIATO et al, 2006; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013). Essa planta apresenta uso na medicina popular com diversas indicações terapêuticas, demonstrando ações farmacológicas como efeitos hipoglicemiantes, antimicrobiano e antiinflamatório (MIGLIATO et al, 2006; MIGLIATO et al, 2007; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012), sugerindo-se um valor terapêutico promissor (GOWRI, VASANTHA, 2010), inclusive demonstrando ação antifúngica sobre diferentes espécies de *Candida* (HÖFLING, et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2007; PEREIRA et al, 2016), indicando a necessidade de investigações sobre seu potencial antifúngico.

Desse modo, este estudo tem como objetivos realizar a identificação dos constituintes químicos do extrato das folhas de *Syzygium cumini* mediante análise fitoquímica, bem como a investigação do potencial antifúngico sobre cepas clínicas e de referência de fungos do gênero *Candida*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico e processamento vegetal

O material botânico utilizado nesse estudo foram folhas de *Syzygium cumini*, as quais foram coletadas em abril de 2015, na zona rural do município de Campina Grande-PB, Brasil (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W). O espécime vegetal foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier (Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB), identificado sob o número de voucher JPB 58.543.

Após a coleta do material, as folhas foram limpas e submetidas à secagem e desidratação em estufa com circulação de ar (FANEM – Modelo 330/5), a temperatura de 45°C, por um período de 14 dias alcançando a estabilização final do peso. Posteriormente, foram pulverizadas em moinho de facas (Solab Científica- Modelo SL 30) de 10 mesh.

O peso inicial das folhas secas de *S. cumini* correspondeu a 458 g, após redução significativa da umidade do material vegetal resultou um total de 450,21 g, significando que o extrato apresenta um bom rendimento.

O método de extração utilizado para obtenção do extrato foi a percolação, com agitação ocasional, realizando-se duas trocas do solvente, durante cinco dias. A proporção utilizada foi de 200g do material vegetal moído para 1000 mL de solução etanólica a 70%. O extrato foi evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40°C com 70 rpm para eliminação do solvente. Posteriormente, o extrato hidroalcoólico foi liofilizado (Liofilizador LS 3000 Terroni[®]) com temperatura de -20°C a -40°C.

Análise fitoquímica

Método de Extração das amostras

Foram utilizados dois métodos para extrair as substâncias do extrato das folhas de *Syzygium cumini*: Extração Líquido-Líquido e Extração em Fase Sólida.

Inicialmente pesou-se 0,0125 mg do extrato liofilizado e dissolveu-se o mesmo em 2,5 mL de uma solução de etanol a uma concentração de 40%.

Em seguida, o extrato dissolvido foi diluído em água ultrapura para obtenção de uma alíquota de 30 mL da amostra e filtrado em membrana de 0,45 µm para remover partículas suspensas (RIGOBELLO et al, 2015).

Extração Líquido-Líquido

Em um funil de separação foi colocado 30 mL do extrato dissolvido a um pH= 7,0, onde foi adicionado 10 g de NaCl. Em seguida iniciou-se a extração dos compostos orgânicos presentes no extrato adicionando-se 100 mL de acetato de etila ao funil de separação. O funil foi selado e agitado por 2,0 min, aliviando-se periodicamente a pressão para a liberação do vapor dos solventes.

A mistura foi deixada em repouso por 30 min para assegurar a separação das fases aquosas e orgânica.

Após esse período foi feita a separação entre o extrato e o acetato de etila, sendo a fase orgânica transferida para um béquer de 250 mL, e a fase aquosa descartada. Em seguida, a fase orgânica foi seca adicionando-se 20 g de NaSO₄ anidro e o sobrenadante filtrado em membrana de acetato de celulose com tamanho dos poros de 0,45 µm, sendo transferido para outro béquer. Em seguida, a fase orgânica extraída foi colocada em um dessecador até reduzido o volume para 3 mL (RIGOBELLO et al, 2015).

Método Cromatográfico

A identificação dos compostos orgânicos presentes no extrato das folhas de *Syzygium cumini* foi realizado em um Cromatógrafo Gasoso (Thermo Scientific TRACE 1300) acoplado a um Espectrômetro de Massas com analisador quadrupolos (Thermo Scientific ISQ-QD).

A separação cromatográfica foi feita em dois tipos de colunas: uma coluna capilar HP-5MS de sílica fundida (30m x 0,25mm x 0,50µm) da Varian Technologies (EZ-Guard Columns) e uma coluna SPB – 624 (30m x 0,25mm x 0,50µm).

A programação de temperatura de forno do CG foi semelhante para as duas colunas utilizadas: 40°C mantido por 2,0 min, 5°C/min até 70°C mantido por 10 min e 10°C/min até 200°C por um tempo de 30 min, respectivamente.

O gás de arraste utilizado foi o Hélio com uma vazão de 1 mL/min. A temperatura do injetor utilizada foi de 250°C no modo *splitless* para uma razão de 33,3.

O volume do material injetado foi de 1 µL e a detecção foi realizada por um detector seletivo de massas equipado com uma fonte de impacto de elétrons a 70 eV.

A aquisição de dados foram obtidas no modo *full scan*. A temperatura da fonte de íons e da linha de transferência do Espectrômetro de Massas foram, respectivamente, 250 e 275°C. A faixa de varredura de *m/z* foi de 50 a 650 com um tempo de corte do solvente igual a 5 min.

Os espectros de massa foram comprados com os compostos de referência da Biblioteca National Institute of Standards and Technology/NIST.

Micro-organismos envolvidos e preparo do inóculo

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), além de cepas clínicas de *Candida albicans* (LM1) e *Candida albicans* (LM3) fornecidas pelo Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde (Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB), onde foram isoladas e identificadas previamente.

Os preparos dos inóculos para a realização dos testes de suscetibilidade foram feitos seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008).

Os micro-organismos foram reativados em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubados a 37°C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C, por 24 h. Após isso o conjunto foi centrifugado e as células suspensas em 10 mL de

solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, as concentrações de células dos inóculos fúngicos foram padronizados com auxílio de espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm. A densidade celular foi estabelecida na absorbância entre 0,08–0,1, equivalente a concentração de 5×10^6 UFC/mL (CLSI, 2008). Procedeu-se à realização de diluições sucessivas, para a obtenção de amostras dos inóculos na concentração de 5×10^3 UFC/mL. Durante a realização dos testes de atividade antifúngica, a concentração testada correspondeu a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL nos poços da microplaca.

Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica do extrato foi determinada com base nas indicações da normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), adotando-se algumas modificações. Os ensaios foram realizados por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008), visando a determinação dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato e dos fármacos frente às cepas de *Candida* avaliadas.

Microplacas de fundo chato com 96 poços (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100 µL de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca 100 µL do extrato (4000 µg/mL), bem como de controles farmacológicos como Nistatina (256 µg/mL) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) e Fluconazol (256 µg/mL) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO).

Controle de viabilidade dos micro-organismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de micro-organismos) e controle do veículo (etanol a 40%, utilizado como substância diluente do extrato) foram também realizados e avaliados para garantir acurácia do método.

Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fileira dos poços para as demais linhas subsequentes. E em seguida, 100 µL da suspensão dos micro-organismos foram inseridos em todos os poços, obtendo uma concentração final de

$2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Desse modo, o extrato foi avaliado entre intervalos de concentrações de 1000 µg/mL a 7,8 µg/mL enquanto os controles farmacológicos de foram avaliados em concentrações que variaram de 64 µg/mL a 0,5 µg/mL.

Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose. Após isso, a viabilidade dos micro-organismos foi determinada através da utilização do corante resazurina (0,01%) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), pipetando-se 50 µL em todos os poços. A metabolização do corante pelos micro-organismos viáveis resultou na conversão do pigmento de coloração azulada para coloração rosa. Após esse período, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi identificada e definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos micro-organismos avaliados (CLSI, 2008). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos a partir da moda dos valores obtidos.

Para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), alíquotas de 10 µL de todos os poços correspondentes as concentrações iguais ou superiores a CIM foram transferidas e semeadas em placas de Petri preparadas com Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e após esse período foi feita a análise visual das mesmas para determinar os valores das CFM.

A CFM foi considerada como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento dos subcultivos. Todos os procedimentos foram feitos em triplicata, sendo os resultados expressos através da moda dos valores obtidos nos experimentos.

Efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

O efeito do extrato das folhas de *S. cumini* sobre a cinética do crescimento foi determinado pela curva de time-kill, segundo metodologia proposta por Cantón et al (2009), Klepser et al (1997) e De Castro et al (2013), com algumas modificações.

Utilizou-se nesse teste cepas de referência de *C. albicans* (ATCC 10231). O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do

inóculo, e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos micro-organismos equivalentes a 5×10^3 UFC/mL.

Microplacas de fundo chato com 96 poços (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100 µL de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 µL do extrato (4000 µg/mL), assim como Nistatina (256 µg/mL) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO). Controle de viabilidade dos micro-organismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de micro-organismos nos poços) e controle do veículo (etanol 40%, diluente do extrato) foram também realizados e avaliados. Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fileira de poços para as demais linhas subsequentes. E em seguida, 100 µL da suspensão dos micro-organismos foram inseridos em todos os poços, obtendo uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008).

Para esse teste, as concentrações avaliadas para o extrato corresponderam aquelas equivalentes a 500, 250 e 125µg/mL, correspondentes respectivamente à 4x CIM, 2x CIM e CIM. Para o controle farmacológico, a nistatina foi avaliada nas concentrações de 16, 8 e 4µg/mL, correspondentes respectivamente aos valores 4x CIM, 2x CIM e CIM.

Realizou-se a semeadura de alíquotas de 10 µL em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 24h. Decorrido esse período, o número de micro-organismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para cada concentração e tempo de análise. Desse modo, por meio deste teste, pôde-se determinar o efeito das substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *C. albicans* (ATCC 10231). O experimento foi feito em triplicata (n=3), e os resultados foram expressos através da média dos números de UFC/mL obtido das triplicatas.

Análise estatística

Os resultados do ensaio da ação do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida* foram analisados por meio do programa SPSS Statistics para Windows® versão 20.0 (IBM, Chicago, USA), considerando-se o nível de significância de 5%. As comparações entre os produtos testados foram realizadas dentro de cada tempo utilizando-se o teste de análise de variância a um fator fixo (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey.

RESULTADOS

Análise fitoquímica

A composição química do extrato das folhas de *S. cumini* encontra-se descrita nos quadros 1 e 2 apresentados a seguir. O quadro 1 descreve os compostos identificados através da análise cromatográfica na coluna capilar HP-5MS, enquanto o quadro 2 descreve compostos identificados a partir da análise na coluna SPB – 624.

Foram considerados e incluídos na descrição das substâncias presentes no extrato os compostos que apresentaram probabilidade $\geq 40\%$ com os picos de referência encontrados pela biblioteca NIST de espectros de massas.

Desse modo, foram identificados 34 compostos diferentes no total, sendo estes distribuídos entre compostos de natureza polar e apolar.

Os resultados mostraram que os cinco compostos que apresentaram maiores valores de probabilidade de acordo com a porcentagem de probabilidade pela biblioteca/NIST dos espectros de massa foram 2,2-Dimetoxibutano (97,77%); 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil- (identificado nas duas colunas, com percentuais de probabilidade iguais a 94,17%, na Coluna SPB – 624 e 93,09% na Coluna capilar HP-5MS); 5-Hidroximetilfurfural (89,15%); 2,4-Di-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furan-3-ona (87,74%); Ácido propanodioico, dimetil éster (83,95%).

Quadro 1- Identificação dos compostos presentes no extrato das folhas de *Syzygium cumini* por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (coluna capilar HP-5MS).

Pico	TR (min)	COMPOSTO	NÚMERO CAS	P (%)	FM	PM
1	5,95	3-Furanmetanol	4412-91-3	44,29	C ₅ H ₆ O ₂	98
2	6,54	4-Ciclopenteno-1,3-diona	930-60-9	46,60	C ₅ H ₄ O ₂	96
3	7,56	Ácido propanodioico, dimetil éster	108-59-8	83,95	C ₅ H ₈ O ₄	132
4	7,79	1,2-Ciclopentanodiona	3008-40-0	44,84	C ₅ H ₆ O ₂	98
5	9,36	2,4-Di-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furan-3-ona	10230-62-3	87,74	C ₆ H ₈ O ₄	144
6	17,86	Timina	65-71-4	65,32	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	126
7	18,77	Dimetil DL-malato	38115-87-6	41,36	C ₆ H ₁₀ O ₅	162
8	19,41	3,3-Dimetil- tietano	13188-85-7	67,50	C ₅ H ₁₀ S	102
9	19,47	4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro- 3,5-di-hidroxi-6-metil-	28564-83-2	93,09	C ₆ H ₈ O ₄	144
10	20,73	Alfa-Terpineol	98-55-5	51,47	C ₁₀ H ₁₈ O	154
11	21,42	Ácido pentanóico, 2,2-dimetil- ,metil éster	813-68-3	45,67	C ₈ H ₁₆ O ₂	144
12	21,98	5-Hidroximetilfurfural	67-47-0	40,63	C ₆ H ₆ O ₃	126
13	22,35	4-Bromo-2-clorofenol	3964-56-5	75,82	C ₆ H ₄ BrClO	206
14	26,19	Fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)	128-39-2	40,17	C ₁₄ H ₂₂ O	206
15	26,42	Ácido benzoico,4-etoxi-,etil éster	23676-09-7	72,01	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194
16	26,69	2-Butinal	1119-19-3	48,20	C ₄ H ₄ O	68
17	27,13	Álcool cariofileno	NA	40,57	C ₁₅ H ₂₆ O	222
18	28,13	Etil α-D-glucopiranosido	NA	53,59	C ₈ H ₁₆ O ₆	208
19	29,98	2-Pentadecanona, 6,10,14- trimetil-	502-69-2	44,54	C ₁₈ H ₃₆ O	268
20	31,17	7,9-di-terc-butil-1- oxaspiro (4.5) deca-6,9-dieno-2,8- diona	82304-66-3	64,36	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276
21	32,33	Palmitato de etilo	628-97-7	47,02	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284

22	35,11	Fitol	150-86-7	43,94	C ₂₀ H ₄₀ O	296
----	-------	-------	----------	-------	-----------------------------------	-----

(Legenda: TR= Tempo de retenção; P = Porcentagem de probabilidade pela biblioteca dos espectros de massa; FM = Fórmula molecular; PM = Peso molecular)

Quadro 2- Identificação dos compostos presentes no extrato das folhas de *Syzygium cumini* por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (Coluna SPB – 624).

Pico	TR (min)	COMPOSTO	NÚMERO CAS	P (%)	FM	PM
1	6,74	2,2-Dimetoxipropano	77-76-9	43,82	C ₅ H ₁₂ O ₂	104
2	8,02	Hidrazina, 1,2-dimetil-	540-73-8	46,06	C ₂ H ₈ N ₂	60
3	9,62	o-terc-Butil-hidroxilamina	NA	52,98	C ₄ H ₁₁ NO	89
4	11,56	2,2-Dimetoxibutano	3453-99-4	97,77	C ₆ H ₁₄ O ₂	118
5	18,23	3,3-dimetoxi-2-butanona	21983-72-2	58,99	C ₆ H ₁₂ O ₃	132
6	18,65	(2-etil-1,3-dioxolan-4-il) metanol	53951-44-3	66,68	C ₆ H ₁₂ O ₃	132
7	21,70	2-Furano metanol	98-00-0	50,76	C ₅ H ₆ O ₂	98
8	24,59	2,4-Di-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furan-3-ona	10230-62-3	62,60	C ₆ H ₈ O ₄	144
9	24,92	2-(5H)-furanona	497-23-4	60,25	C ₄ H ₄ O ₂	84
10	25,33	Dihidroxiacetona	96-26-4	45,72	C ₃ H ₆ O ₃	90
11	25,64	(+)-3,4-Dehidroprolina amida	NA	40,89	C ₅ H ₈ N ₂ O	112
12	29,63	4H-Piran-4-ona, 2,3-di- hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-	28564-83-2	94,17	C ₆ H ₈ O ₄	144
13	32,53	5-Hidroximetilfurfural	67-47-0	89,15	C ₆ H ₆ O ₃	126
14	34,68	Hidroquinona	123-31-9	40,73	C ₆ H ₆ O ₂	110

(Legenda: TR= Tempo de retenção; P = Porcentagem de probabilidade pela biblioteca dos espectros de massa; FM = Fórmula molecular; PM = Peso molecular)

Atividade antifúngica

A atividade antifúngica do extrato e dos fármacos padrão sobre as cepas de *Candida* foi avaliada por meio da determinação das concentrações capazes de exercer efeitos inibitórios e letais sobre o crescimento dos microrganismos (tabela 1)

expressos através dos valores da CIM e CFM, bem como a descrição da relação CFM/CIM.

Tabela 1- Atividade antifúngica do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e de fármacos padrão sobre fungos do gênero *Candida* (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL).

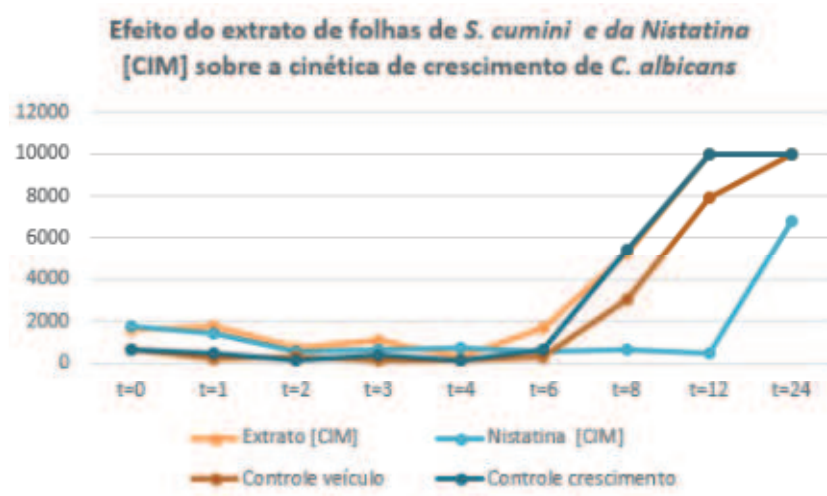
MICRO-ORGANISMOS/SUBSTÂNCIAS	CIM	CFM	Relação CFM/CIM
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)			
Extrato <i>S. cumini</i>	125	1000	8
Nistatina	4	64	16
Fluconazol	32	>64	>2
<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)			
Extrato <i>S. cumini</i>	62,5	>1000	>16
Nistatina	2	64	32
Fluconazol	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231) + <i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)			
Extrato <i>S. cumini</i>	125	1000	8
Nistatina	4	32	8
Fluconazol	>64	>64	>1
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)			
Extrato <i>S. cumini</i>	31,25	250	8
Nistatina	>64	>64	>1
Fluconazol	>64	>64	>1
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)			
Extrato <i>S. cumini</i>	62,5	>1000	>16
Nistatina	4	>64	>16
Fluconazol	8	>64	>8
<i>C. albicans</i> (LM1)			
Extrato <i>S. cumini</i>	31,25	1000	32
Nistatina	4	16	4

Fluconazol	64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (LM3)			
Extrato <i>S. cumini</i>	31,25	>1000	>32
Nistatina	2	>64	>32
Fluconazol	32	>64	>2

Diante dos dados, percebe-se que o extrato das folhas de *S. cumini* apresenta efeitos antifúngicos sobre as cepas de *Candida* testadas, demonstrado valores de CIM entre 31,25 a 125 µg/mL para esses micro-organismos. Observa-se que as cepas de isolados clínicos de *C. albicans* (LM1) e *C. albicans* (LM3) e a cepa de referência de *C. krusei* (ATCC 6258) apresentam maior sensibilidade à ação antifúngica do extrato.

Efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

A análise sobre o efeito antifúngico do extrato de *S. cumini* e da Nistatina sobre o crescimento de células planctônicas de *C. albicans* (ATCC 10231) foi avaliada sob diferentes concentrações e tempos de ação das substâncias (Figura 1 e Tabela 2), visando a investigação dos seus efeitos sobre a cinética do crescimento desse micro-organismo.



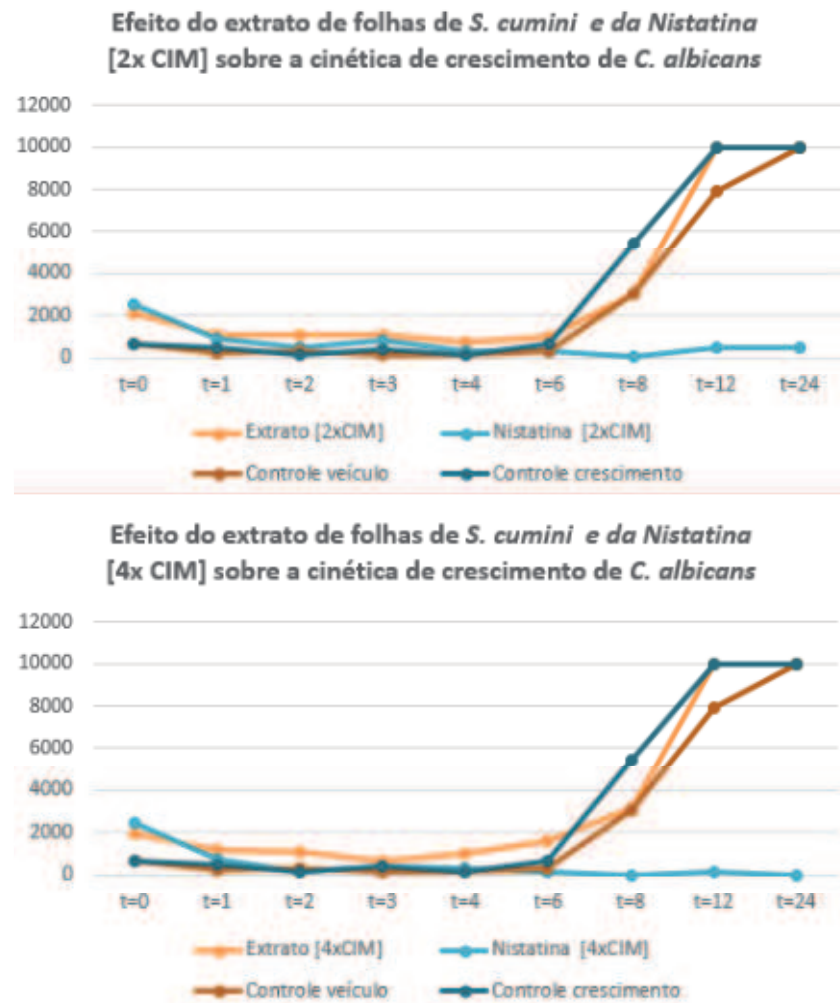


Figura 1. Efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e Nistatina sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231). Resultados expressos através da média do número de micro-organismos (em UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação sob exposição ao extrato e a Nistatina.

Tabela 2- Efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e da Nistatina sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) (valores expressos em média do número de UFC/mL).

Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa

T	Gr	Conc.	Mean	SD		p	T	Gr	Conc.	Mean	SD		p
0h	Extr	CIM	1566,67	152,75	a	0,697	6h	Extr	CIM	1666,67	1858,31	a	0,096
		2xCIM	2133,33	896,29	a				2xCIM	1000,0	360,56	a	
		4xCIM	1933,33	577,35	a				4xCIM	1600,0	1228,82	a	
	Nist	CIM	1733,33	776,75	a			Nist	CIM	566,67	814,45	a	
		2xCIM	2500,0	1135,78	a				2xCIM	266,67	288,68	a	
		4xCIM	2433,33	115,47	a				4xCIM	100,0	173,21	a	
	CV		611,11	280,38	a			CV		344,44	412,65	a	
		CC	655,0	72,78	a				CC	655,0	692,96	a	
	CC							CC					
1h	Extr	CIM	1800,0	458,26	a	0,059	8h	Extr	CIM	5300,0	4256,76	a	0,001
		2xCIM	1066,67	115,47	a				2xCIM	3000,0	2457,64	a	
		4xCIM	1200,0	871,78	a				4xCIM	3100,0	1539,48	a	
	Nist	CIM	1433,33	650,64	a			Nist	CIM	666,67	305,51	b	
		2xCIM	900,0	624,5	a				2xCIM	66,67	57,74	bc	
		4xCIM	733,33	305,51	a				4xCIM	0,0	0,0	c	
	CV		233,33	150,0	a			CV		3022,22	3592,28	a	
		CC	444,33	120,3	a				CC	5400,0	4267,32	a	
	CC							CC					
2h	Extr	CIM	700,0	458,26	a	0,100	12h	Extr	CIM	10000,0	0,0	b	0,001
		2xCIM	1033,33	665,83	a				2xCIM	10000,0	0,0	b	
		4xCIM	1100,0	458,26	a				4xCIM	10000,0	0,0	c	
	Nist	CIM	533,33	321,46	a			Nist	CIM	466,67	115,47	a	
		2xCIM	500,0	264,58	a				2xCIM	466,67	461,88	a	
		4xCIM	133,33	152,75	a				4xCIM	166,67	288,68	a	
	CV		300,0	223,61	a			CV		7877,78	3281,68	a	
		CC	100,0	86,6	a				CC	10000,0	0,0	a	
	CC							CC					
3h	Extr	CIM	1033,33	901,85	a	0,095	24h	Extr	CIM	10000,0	0,0	b	0,001
		2xCIM	1033,33	1040,83	a				2xCIM	10000,0	0,0	b	
		4xCIM	666,67	152,75	a				4xCIM	10000,0	0,0	b	

	Nist	CIM	633,33	208,17	a		Nist	CIM	6800,0	5542,56	a	
		2xCIM	800,0	624,5	a			2xCIM	466,67	723,42	a	
		4xCIM	433,33	450,92	a			4xCIM	0,0	0,0	a	
	CV		133,33	141,42	a		CV		10000,0	0,0	a	
	CC		355,33	344,56	a		CC		10000,0	0,0	a	
4h	Extr	CIM	333,33	57,74	a	0,135						
		2xCIM	766,67	57,74	a							
		4xCIM	966,67	351,19	a							
	Nist	CIM	700,0	721,11	a							
		2xCIM	266,67	115,47	a							
		4xCIM	266,67	152,75	a							
	CV		100,0	158,11	a							
	CC		166,33	152,53	a							

(Legenda: T= Tempo; Gr =Grupos testados (Extr.=Extrato; Nist=Nistatina; CV= Controle do veículo; CC= Controle de crescimento); Mean= Média do número de UFC/mL; SD= Desvio padrão; p= valor de p obtido através da análise estatística)

De modo geral, comparando-se separadamente os grupos experimentais nas diferentes concentrações testadas e os grupos controle nos diferentes períodos de tempo avaliados (figura 1), a exposição dos micro-organismos a concentrações do extrato equivalentes a CIM (125µg/mL) e 2x CIM (250 µg/mL) demonstrou menores valores de média de número de UFC/mL no período de quatro horas de exposição. Por outro lado, considerando-se os mesmos parâmetros, para a maior concentração testada (4x CIM= 500 µg/mL), o número de micro-organismos sofreu a maior redução quantitativa no número de UFC/mL no período equivalente a três horas de contato com o mesmo.

Entretanto, a comparação entre os grupos experimentais com suas respectivas concentrações e os grupos controle dentro de cada período de tempo (tabela 2) evidenciou que embora os menores valores de média do número de UFC/mL foram observados nos períodos de três a quatro horas de exposição ao extrato, esses dados não demonstram diferença estatisticamente significativa em relação a Nistatina e aos controles utilizados nesse teste.

Diferença estatisticamente significativa foi observada apenas no intervalo de tempo igual ou superior a oito horas de exposição de *C. albicans* às diferentes concentrações (125, 250 e 500 µg/mL) do extrato de *S. cumini*, sendo esta diferença verificada em comparação aquela obtida para as diferentes concentrações da Nistatina (4, 8 e 16 µg/mL).

Por outro lado, nos períodos de exposição de 12 e 24 horas, o extrato de *S. cumini* não demonstrou efeitos sobre a inibição do crescimento fúngico, visto que nesses períodos de tempo os micro-organismos apresentaram crescimento máximo verificado. Entretanto, a Nistatina foi capaz de provocar uma redução do número de micro-organismos, apresentando, entretanto, discreto aumento quantitativo no crescimento dos mesmos, quando testada na concentração equivalente a CIM ou e até mesmo eliminação destes na concentração equivalente a 4x CIM. O efeito antifúngico observado para a Nistatina nesses períodos de tempo exibiu diferença estatisticamente significativa quando comparada aquele observado pelo contato dos micro-organismos com as diferentes concentrações do extrato.

Os resultados dessa análise sugerem que o extrato apresenta ação fungistática sobre *C. albicans* (ATCC 10231), demonstrando efeito inibitório significativo sobre o crescimento desse micro-organismo, sobretudo quando o mesmo é exposto a ação do extrato em um intervalo de tempo de 8 horas.

DISCUSSÃO

A diminuição da susceptibilidade e/ou resistência aos agentes tradicionalmente utilizados na terapêutica antifúngica (THEIN et al, 2009; DOI et al, 2016; GULATI; NOBILE, 2016; SAVASTRANO et al, 2016) tem evidenciado e sinalizado a necessidade da investigação de novas substâncias com potencial antifúngico (FENNER et al, 2006; COSTA et al, 2009; COLEMAN et al, 2010; PEREIRA et al, 2016), inclusive aquelas à base de plantas medicinais e/ou extratos, a exemplo do *Syzygium cumini*.

Nesse cenário, uma vez que diferentes atividades biológicas que podem ser atribuídas à presença de determinados compostos presentes nas plantas (AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009; EVENSEN; BRAUN, 2009), pode-se

menção que a atribuição de possíveis efeitos antimicrobianos relacionados ao extrato de folhas de *S. cumini*, investigada no presente estudo pode ser atribuída em virtude da presença de grupos de compostos bioativos como saponinas, compostos fenólicos, taninos e flavonoides realizados mediante triagem fitoquímica preliminar (CARTAXO-FURTADO et al, 2015; PEREIRA et al, 2016).

Isso pode ser corroborado com base nas evidências disponíveis na literatura, as quais associam a presença de determinados grupos de compostos fitoquímicos a existência de diferentes atividades biológicas, a exemplo de efeitos antimicrobianos a compostos fenólicos (SOOBRAATTEE et al, 2005; HARSHA; ANILAKUMAR, 2014; CARTAXO-FURTADO et al, 2015), flavonoides (AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009; CARTAXO-FURTADO et al, 2015) e taninos (AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009; GOWRI; VASANTHA, 2010; CARTAXO-FURTADO et al, 2015), bem como efeitos antifúngicos a compostos fenólicos (EVENSEN; BRAUN, 2009), flavonoides (PEREIRA et al, 2016) e saponinas (AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009; GOWRI; VASANTHA, 2010; COLEMAN et al, 2010; PEREIRA et al, 2016).

Desse modo, a identificação fitoquímica (CG-EM) realizada neste estudo confirma a presença de diversas substâncias pertencentes as diferentes classes de compostos mencionados, corroborando assim a possibilidade da existência desses efeitos antimicrobianos, além de permitir identificar de forma mais específica a composição química do extrato, inclusive evidenciando os possíveis compostos majoritários responsáveis pela atividade biológica de interesse.

Dentre os compostos identificados no extrato, o 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil- pertence à classe dos flavonoides (TEOH; DON; UJANG, 2011; TEOH; DON, 2015), podendo-se sugerir que esse composto possa ser uma das substâncias responsáveis pela atividade biológica do extrato, uma vez que o mesmo apresenta relatos de ação antimicrobiana, antifúngica (TEOH; DON; UJANG, 2011; PENG; DON, 2013; TEOH; DON, 2015) e antioxidante, dentre outras (ČECHOVSKÁ et al, 2011; TEOH; DON; UJANG, 2011; PENG; DON, 2013).

Além da identificação fitoquímica do extrato, a investigação da ação antifúngica desse material vegetal suscita a necessidade de conhecer e classificar a atividade antimicrobiana do mesmo frente a diferentes micro-organismos, podendo esta ser estabelecida com base no nível de inibição microbiana a partir dos valores

da CIM demonstrado sobre os microorganismos avaliados (ALIGIANNIS et al, 2001; HOLETZ et al, 2002; SARTORATTO et al 2004; MORALES et al, 2008).

Nessa perspectiva, pode-se afirmar que o extrato das folhas de *S. cumini* apresenta potencial antimicrobiano ativo sobre todas as cepas de *Candida* testadas, dado ter demonstrado valores de CIM <1000 µg/mL para esses micro-organismos (HOLETZ et al, 2002; MORALES et al, 2008).

Ademais, sinaliza-se que o potencial antimicrobiano do extrato pode ser caracterizado como bom (CIM<100 µg/mL) a moderado (CIM de 100 µg/mL -500 µg/mL) (HOLETZ et al, 2002; MORALES et al, 2008) para os micro-organismos testados, tendo demonstrado um bom potencial antimicrobiano sobre cepas de *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. krusei* (ATCC 6258), e cepas de isolados clínicos *C. albicans* (LM1) e *C. albicans* (LM3), enquanto que para a *C. albicans* (ATCC 10231) e para a associação de *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030), o extrato demonstrou um potencial antimicrobiano moderado.

Por outro lado, de acordo com as classificações propostas por Aligiannis et al (2001) e Sartoratto et al (2004), o extrato pode ser considerado como detentor de forte potencial antimicrobiano para todas as cepas de *Candida* avaliadas, conforme classificação de acordo com os valores de CIM ≤500 µg/mL (Aligiannis et al, 2001) e CIM entre 50 µg/mL-500 µg/mL (Sartoratto et al, 2004).

A investigação do potencial antifúngico do extrato permitiu também caracterizá-lo quanto a sua atividade antifúngica com base na avaliação da relação CFM/CIM proposta por Siddiqui et al (2013), tendo demonstrado ação fungistática (CFM/CIM ≥ 4) sobre todas as cepas de *Candida* avaliadas. Esses dados permitem corroborar os resultados de investigações preliminares realizados sobre *C. albicans* (ATCC 10231) (PEREIRA et al, 2016), permitindo ainda expandir a constatação desse efeito inibitório de crescimento do extrato sobre diferentes cepas adicionais de fungos do gênero *Candida*, inclusive cepas obtidas de isolados clínicos de pacientes imunodeprimidos.

Neste estudo é de grande importância focar o bom potencial antifúngico, de acordo com Holetz et al (2002) e Morales et al (2008), apresentado pelo extrato de *S. cumini* sobre a inibição de crescimento de cepas provenientes de isolados clínicos.

Nessa perspectiva, esses achados são promissores, uma vez que diferentemente da tendência de micro-organismos obtidos através de isolados clínicos apresentarem maior resistência antifúngica, inclusive às drogas padrão (OLIVEIRA et al, 2007; COSTA et al, 2009; DE CASTRO et al, 2013), essas cepas demonstram maior sensibilidade à ação do extrato, inclusive quando comparada a maioria das cepas de referência analisadas.

Por outro lado, quando comparado a suscetibilidade dos micro-organismos aos agentes antifúngicos padrão, pôde-se evidenciar uma menor sensibilidade de algumas cepas como *C. glabrata* (ATCC 90030), associação de *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030) e *C. krusei* (ATCC 6258), à ação do fluconazol, corroborando a problemática evidenciada anteriormente acerca da demonstração de efeitos de resistência microbiana dessa natureza frente a esse e a outros antifúngicos usualmente empregados na terapêutica de candidose bucal (THEIN et al, 2009; DOI et al, 2016; GULATI; NOBILE, 2016; SAVASTRANO et al, 2016).

De modo semelhante, a constatação da menor sensibilidade antifúngica evidenciada pela associação de *C. albicans* (ATCC 10231) com a *C. glabrata* (ATCC 90030) frente a ação do extrato e do fluconazol reflete e corrobora a comprovação de um maior padrão de patogenicidade e virulência atribuída a associação desses micro-organismos. Esse dado corrobora os achados de estudos que caracterizam a co-infecção desses micro-organismos como uma condição de difícil tratamento (ALVES et al, 2014), evidenciada em virtude de sua resistência ao fluconazol (GOMES et al, 2011; SAVASTANO et al, 2016) e a outros agentes antifúngicos como miconazol, itraconazol, e anfotericina B (SAVASTANO et al, 2016).

De todo modo, com base nos resultados obtidos neste estudo e de acordo com os sistemas de classificações para a categorização do nível de inibição microbiana, pode-se afirmar que o extrato de folhas de *S. cumini* apresenta potencial antimicrobiano promissor sobre as cepas de *Candida*. Essa afirmação também encontra respaldo a partir dos achados de outros estudos prévios realizados com extrato obtido a partir das folhas de *S. cumini* (OLIVEIRA et al, 2007; COSTA et al, 2009; PEREIRA et al, 2016).

Nesse aspecto, entretanto é necessário enfatizar que a despeito desses resultados, a existência de diferenças metodológicas nos estudos, sobretudo nos de Oliveira et al (2007) e Costa et al (2009) pode representar variações que podem

influenciar nos resultados dos níveis de inibição microbiana, devendo, portanto, ser considerados e ponderados, sobretudo no que se refere aos aspectos associados a forma de obtenção, processamento do material vegetal e padronização do extrato; a categoria e as espécies de micro-organismos avaliados, como por exemplo da utilização de cepas de referência e/ou cepas clínicas isoladas de pacientes; além metodologias dos testes de verificação dos efeitos antimicrobianos (COSTA et al, 2009).

Por outro lado, resultados como os de Pereira et al (2016), representam as mesmas condições de utilização do material vegetal que aquelas utilizadas no presente estudo, visto que ambas as investigações empregam o extrato obtido a partir da mesma planta e sob as mesmas condições. Desse modo, o presente estudo permitiu a reprodutibilidade de alguns parâmetros previamente avaliados por Pereira et al (2016), além de contemplar a realização de investigações adicionais às previamente obtidas. Nesse sentido, essas investigações complementares referem-se sobretudo à utilização de ensaios empregando cepas de *Candida* diferentes das previamente avaliadas, além de incluir as análises com cepas provenientes de isolados clínicos de pacientes. Assim, a presente pesquisa representa um conjunto de investigações referentes a longitudinalidade dos ensaios destinados a bioprospecção dos efeitos biológicos do extrato das folhas de *S. cumini*.

Adicionalmente, a investigação do efeito biológico do extrato de folhas de *S. cumini* sob diferentes concentrações e intervalos de tempo teve sua importância ressaltada sobretudo em virtude de permitir elucidar as melhores condições nas quais o mesmo exerceu seu efeito antimicrobiano (KLEPSE et al, 1997; CANTÓN et al, 2009; DE CASTRO et al, 2013), determinando, portanto, os melhores perfis para os quais sua utilização poderia ser indicada.

Assim, ao mesmo tempo em que a realização desse teste representou uma abordagem inédita, em virtude da ausência de investigações preliminares através de ensaios desse tipo envolvendo o extrato das folhas de *S. cumini*, permitiu também estimar um possível intervalo de tempo para o qual o extrato é capaz de exercer o melhor efeito antifúngico, sinalizando uma possível evidência a ser preconizada na posologia do mesmo em uma futura utilização clínica.

Nesse sentido, uma vez que o cumprimento do correto intervalo de tempo preconizado entre administrações sucessivas de um antimicrobiano representa um

dos fatores cruciais no sentido de se evitar o desenvolvimento da resistência microbiana, sobretudo em substâncias fungistáticas (ANDES et al, 2006), o conhecimento desse parâmetro deve ser levado em consideração no sentido de prevenir a ocorrência de uma possível indução de resistência microbiana frente a utilização do extrato das folhas de *S. cumini*, dado o efeito fungistático evidenciado pelo mesmo.

Em virtude da investigação da atividade antimicrobiana desse extrato vegetal ter demonstrado resultados promissores, e considerando-se a possibilidade de uma futura indicação terapêutica do mesmo (COSTA et al, 2009), investigações adicionais são necessários durante as análises de bioprospecção dos efeitos biológicos do extrato das folhas de *S. cumini*, a exemplo de análises direcionadas à avaliações de aspectos relacionados à citotoxicidade *in vitro* do mesmo, bem como acerca de sua toxicidade *in vivo*.

CONCLUSÕES

O extrato de folhas de *S. cumini* apresenta potencial antimicrobiano ativo, demonstrando efeitos antifúngicos promissores, sobre as cepas de *Candida* testadas. Esses efeitos podem ser atribuídos à presença de compostos majoritários identificados no extrato, sobretudo o 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-, dada a ação antimicrobiana e antifúngica associada a esse composto. O extrato apresenta ação fungistática sobre as espécies de *Candida* avaliadas, exercendo efeito sobre a inibição do crescimento fúngico de *C. albicans*, sendo esse significativo em períodos de tempo de oito horas de exposição à diferentes concentrações do extrato. Em virtude do extrato de folhas de *S. cumini* ter demonstrado resultados promissores, e considerando-se a possibilidade de perspectivas futuras quanto à indicação e utilização clínica do mesmo como modalidade terapêutica antifúngica alternativa, investigações adicionais são necessários para avaliar aspectos relativos à citotoxicidade e toxicidade do mesmo.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não declaram nenhum conflito de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de auxílio financeiro que tornou viável a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

Aiyelaagbe, O.O., & Osamudiamen P.M. (2009). Phytochemical screening for active compounds in *Mangifera indica* leaves from Ibadan, Oyo State. *Plant Sciences Research*, 2 (1), 11-13.

Alligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I.B. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9),4168-4170. doi: 10.1021/jf001494m

Alves, C.T., Wei ,X.Q., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M., & Williams, D.W. (2014) *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *Journal of Infection*, 69(4), 396-407. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.002>

Andes, D., Forrest, A., Lepak, A., Nett, J., Marchillo, K. & Lincoln, L. (2006) Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance *in vivo*: fluconazole and *Candida albicans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(7),2374-2383. doi: 10.1128/AAC.01053-05

Ayyanmar, M. & Subash-Babu, P. (2012) *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 240-246. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60050-1.

Bensadoun, R.J., Patton, L.L., Lalla, R.V. & J.B. (2011). Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update 2011. *Supportive Care in Cancer*, 19(6):737-744. doi: 10.1007/s00520-011-1154-4

Cantón,E., Pemán,J., Valentín,A., Espinel- Ingroff,A.,& Gobernado,M. (2009). In vitro activities of Echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 3108–3111.

Cartaxo-Furtado, N.A.D.E.O., Sampaio, T.O., Xavier, M.A., Medeiros, A.D.D.E., & Pereira, J.V. (2015). Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17(4),1091-1096. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_153

Čechovská, L., Cejpek, K., Konečný, M. & Velíšek, J. (2011). On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. *European Food Research and Technology*, 233(3), 367–376. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1527-4>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) *Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3*. CLSI, Wayne: Pennsylvania.

Coleman, J.J., Okoli, I., Tegos, G.P., Holson, E.B., Wagner, F.F., Hamblin, M.R. & Mylonakis, E. (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chemical Biology*, 5(3), 321-332. doi: 10.1021/cb900243b

Costa, A.C.B.P., Pereira, C.A., Freire, F., Junqueira, J.C. & Jorge, A.O.C. (2009) Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. *Revista de Odontologia da UNESP*, 38(2), 111-116.

De Castro, R.D., Lima, E.O., Freires, I.A. & Alves, L.A. (2013) Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12(2), 149-156. doi:10.9771/cmbio.v12i2.8448

Doi, A.M., Pignatari, A.C.C., Edmond, M.B., Marra, A.R., Camargo, L.F.A., Siqueira, R.A., Mota, V.P. & Colombo, A.L. (2016) Epidemiology and microbiologic characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PLoS ONE*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>

Evensen, N.A. & Braun, P.C. (2009) The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(9), 1033-1039. doi: 10.1139/w09-058.

Fenner, R. Betti, A.H., Mentz, L.A. & Rates, S.M.K. (2006) Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(3), 369-394 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000300007>

Gomes, P.N., Da Silva, W.J., Pousa, C.C., Narvaes, E.A.O. & Cury, A.A.D.B. (2011) Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1274-1281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.04.006>

Gow, N.A.R., Van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J.P. & Netea, M.G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 112-122. doi: 10.1038/nrmicro2711.

- Gowri, S.S. & Vasantha, K. (2010) Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1569-1573.
- Gulati, M. & Nobile, C.J. (2016) *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310-321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Harsha, S.N. & Anilakumar, K.R. (2014) *In vitro* free radical scavenging and DNA damage protective property of *Coriandrum sativum* L. leaves extract. *Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1533-1539. doi: 10.1007/s13197-012-0648-5.
- Höfling, J.F., Anibal, P.C., Obando-Pereda, G.A., Peixoto, I.A., Furletti, V.F., Foglio, M.A. & Gonçalves, R.B. (2010) Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1065-1068. <https://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000500022>
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N. R., Cortez, D. A.G., Nakamura, C. V. & Dias Filho, B.P. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>
- Klepser, M.E., Wolfe, E.J., Jones, R.N., Nightingale, C.H. & Pfaller, M.A. (1997) Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(6), 1392–1395.
- Martins, C.H., Pires, R.H., Cunha, A.O., Pereira, C.A., Singulani, J. L., Abrão, F., De Moraes, T. & Mendes-Giannini, M.J.S. (2016) *Candida/Candida* biofilms. First description of dual species *Candida albicans*/*C. rugosa* biofilm. *Fungal Biology*, 120(4), 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.013>
- Migliato, K.F., Baby, A.R., Zague, V., Velasco, M.V.R., Corrêa, M.A., Sacramento, L.V.S. & Salgado, H.R.N. (2006). Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta farmacéutica bonaerense*, 25(2), 310-314.
- Migliato, K.F., Moreira, R.R.D., Mello, J.C.P., Sacramento, L.V.S., Corrêa, M.A. & Salgado, H.R.N. (2007) Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 94-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100018>
- Morales, G., Paredes, A., Sierra, P. & Loyola, L.A. (2008) Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*, 13(4):790-794. doi:10.3390/molecules13040790
- Oliveira, G.F., Furtado, N.A.J.C., Silva-Filho, A.A., Martins, C.H.G., Bastos, J.N., Cunha, W.R. & Silva, M.L.A. (2007) Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 381-384. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200035>

Peleg, A.Y., Hogan, D.A.; & Mylonakis, E. (2010) Medically important bacterial–fungal Interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5),340–349. doi:10.1038/nrmicro2313

Peng, T.Y.& Don, M.M. (2013) Antifungal Activity of *in-vitro* Grown *Earliella Scabrosa*, a Malaysian Fungus on Selected Wood-degrading Fungi of Rubberwood. *Journal of Physical Science*, 24(2), 21–33.

Pereira, J.V., Freires, I.A., Castilho, A.R., da Cunha, M.G., Alves, H.S. & Rosalen, P.L. (2016). Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology*,54(10),2312-2319. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2016.1155629>

Rigobello, E. S., Scandelai, A. P. J., Corso, B. L., & Tavares, C. R. G. (2015). Identificação de compostos orgânicos em lixiviados de aterro sanitário municipal por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. *Química Nova*, 38(6), 794-800.<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150092>

Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4),275-280. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>

Savastano, C., Silva, E. O., Gonçalves, L.L., Nery, J.M., Silva, N.C., & Dias, A.L.T. (2016). *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 367-372. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.05.001>

Siddiqui, Z.N., Farooq, F., Musthafa, T.N.M., Ahmad, A. & Khan, A.U. (2013) Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.03.016>

Silva, S., Henriques, M., Hayes, A., Oliveira, R., Azeredo, J. & Williams, D.W. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 40(5),421-427. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00981.x.

Silva-Rocha, W.P., Lemos, V.L.B., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., Svidziski, T.I.E., Milan, E.P. & Chaves, G.M.(2015). Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(6), 1-15.doi: 10.1186/s12906-015-0522-x

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-ramma, A., Aruoma, O.I. & Baborun, T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,579(1-2), 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>

Srivastava, S.& Chandra, D.(2013) Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*:a review.*Journal of the Science of Food and Agriculture*,93(9),2084–2093. doi:10.1002/jsfa.6111

Teoh, Y.P., Don, M.M.& Ujang, S.(2011) Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and GC-MS study by *Pycnoporus sanguineus*. *BioResources*, 6(3),2719-2731

Teoh, Y.P. & Don, M.M. (2015) Mycelia Growth and Production of Total Flavonoids and 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- by *Schizophyllum commune* Using a Bubble Column Bioreactor Considering Aeration Effect and Mass Transfer Study. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*, 28(4),553–559.doi: 10.15255/CABEQ.2014.2024

Thein, Z.M., Samaranayake, Y.H. & Samaranayake, L.P. (2006) Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 51(8), 672-680. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.02.005>

Thein, Z.M., Seneviratne, C.J., Samaranayake, Y.H. & Samaranayake, L.P. (2009) Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*,52(6), 467-475.doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01719.x.

Williams, D. & Lewis, M. (2011) Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*,3, 57-71. doi: 10.3402/jom.v3i0.5771

Zomorodian K., Haghighi,N.N., Rajaei, N., Pakshir, K., Tarazooie, B., Vojdani ,M., Sedaghat, F.& Vosoghi M. (2011)Assessment of *Candida* species colonization and denture related stomatitis in complete denture wearers. *Medical Mycology*, 49(2), 208-211. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.507605>

ARTIGO 2

Periódico: Archives of Oral Biology

Fator de Impacto:1,733

Qualis Odontologia A2

Artigo formatado Segundo as normas de publicação do periódico (Anexo B)

Investigação dos potenciais citotóxico, oxidante e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel

Ernani Canuto Figueirêdo Júnior^a; Tayná Ribeiro Monteiro de Figueiredo^b; Andressa Brito Lira^c; Hilzeth de Luna Freire Pessoa^c; Jozinete Vieira Pereira^{*a}

^aPrograma de Pós-Graduação em Odontologia- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB

^bDepartamento de Odontologia- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB

^c Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB

*Autor correspondente:

Jozinete Vieira Pereira Marques

Programa de Pós-Graduação em Odontologia- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB

Telefone: (83) 3315-3300

E-mail: jozinetevieira@hotmail.com

RESUMO:

OBJETIVO: O objetivo desse estudo foi analisar os potenciais citotóxico, oxidante e antioxidante do extrato bruto das folhas de *Syzygium cumini*. (L.) Skeel. **METODOLOGIA:** As folhas de *S. cumini* (Myrtaceae) foram coletadas na região do semiárido paraibano, no município de Campina Grande/PB, Brasil. O extrato foi obtido por método de percolação. Testes de citotoxicidade foram realizados a partir dos ensaios de hemólise e fragilidade osmótica em eritrócitos humanos. Avaliou-se também o potencial oxidante e antioxidante do extrato na presença de fenilhidrazina e espécies reativas de oxigênio, respectivamente. Dados foram avaliados através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett, admitindo valor $\alpha=0,05$. **RESULTADOS:** O extrato apresenta baixa atividade hemolítica em concentrações de 31,25; 62,5 e 125 $\mu\text{g/mL}$, exercendo efeito protetor sobre hemólise induzida por estresse osmótico, nessas mesmas concentrações, dependendo do tipo sanguíneo testado. Além disso, as concentrações de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ demonstram efeitos antioxidantes frente a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. Entretanto, não demonstra ação antioxidante frente a fenilhidrazina, ao mesmo tempo em que quando utilizado em concentrações $\leq 125 \mu\text{g/mL}$ não induz a ocorrência de oxidação nos eritrócitos. **CONCLUSÕES:** Em concentrações terapêuticas, o extrato demonstrou baixa citotoxicidade sobre eritrócitos, apresentando efeito protetor sobre células expostas a situações de estresse osmótico e oxidativo. Portanto, sugere-se a possibilidade de mais análises citotóxicas *in vivo* tendo em vista perspectivas futuras quanto a sua indicação e utilização clínica.

Palavras-chave: Extratos de plantas; *Syzygium cumini*; Testes de toxicidade; Eritrócitos; Antioxidantes.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of this study was to analyze the cytotoxic, oxidant and antioxidant potentials of the raw extract of *Syzygium cumini* leaves. (L.) Skeel. **METHODOLOGY:** The *S. cumini* (Myrtaceae) leaves were collected in Campina Grande, in the semiarid region of Paraíba, Brazil. The extract was obtained by percolation. Cytotoxicity tests were done from the hemolysis and osmotic fragility experiments in human erythrocytes. We also examined the extract's oxidant and antioxidant potentials in the presence of phenylhydrazine and reactive oxygen species, respectively. The data were evaluated by the ANOVA test and by the Dunnett post-tests, considering the value $\alpha=0,05$. **RESULTS:** The extract shows a low hemolytic activity in concentrations of 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL and 125 µg/mL, having a protective effect over osmotic stress induced hemolysis, at the same concentrations, depending on the blood type used. The concentrations of 31,25 µg/mL and 62,5 µg/mL show antioxidant effects in relation to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. However, there is no antioxidant action when it is exposed to phenylhydrazine and it does not induce oxidation in the erythrocytes when used in concentrations ≤ 125 µg/mL.

CONCLUSIONS: In therapeutic concentrations the extract showed a low cytotoxicity over the erythrocytes, manifesting a protective effect over cells exposed to osmotic and oxidative stress situations. Thus, we suggest that new cytotoxic analysis *in vivo* should be done in order to discover future perspectives about its indication and clinical use.

Key words: Plants extracts; *Syzygium cumini*; Toxicity tests; Erythrocytes; Antioxidants.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para fins curativos é uma prática que remota origens antigas (BRASIL, 2006). Desde os primórdios da humanidade e durante um longo período de tempo constituíram a única fonte de substâncias para as quais os homens dispunham para utilização com finalidades terapêuticas (MIGLIATO et al, 2007).

A indicação popular do uso das plantas medicinais é importante para a abordagem e indicação da seleção de plantas para a investigação de seu potencial farmacológico e da comprovação de sua ação e eficácia como fonte promissora para a descoberta de novos agentes terapêuticos alternativos para o tratamento de doenças (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Uma vez que as pesquisas envolvendo plantas medicinais e/ou extratos podem fornecer resultados terapêuticos promissores para a elucidação de novas

possibilidades terapêuticas direcionadas para o tratamento de infecções de interesse para a Odontologia, (COSTA et al, 2009).

Nessa perspectiva, destaca-se o *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae, apresentando outras sinonímias como *Syzygium jambolanum*, *Eugenia jambolana*, *Eugenia cumini*. Nativa de regiões tropicais, essa planta pode ser encontrada em algumas regiões subtropicais, inclusive no Brasil, onde distribui-se nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte, sendo conhecida popularmente por jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva. (MIGLIATO et al, 2006; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012; BALIGA et al, 2013; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013). Diferentes partes dessa planta são indicadas e utilizadas na medicina popular para diversas finalidades terapêuticas, demonstrando efeitos hipoglicemiantes, antimicrobianos e antiinflamatórios (MIGLIATO et al, 2006; MIGLIATO et al, 2007; AYYNAMAR; SUBASH-BABU, 2012; BALIGA et al, 2013; CHAGAS et al, 2015), sinalizando a existência de potencial efeito antimicrobiano de interesse para a Odontologia.

Nesse aspecto, torna-se necessário realizar investigações sobre os potenciais efeitos biológicos que o uso de extratos à base dessa planta pode causar (PEREIRA et al, 2016), sobretudo aquelas direcionadas a investigações de parâmetros relacionados à sua eficácia e segurança, visando a fornecer informações que possam assegurar a garantia e o controle de qualidade de seu uso (MIGLIATO et al, 2007; NOLDIN et al, 2003; VARANDA, 2006).

Desse modo, este estudo tem como objetivos realizar a investigação dos potenciais citotóxico, oxidante e antioxidante do extrato das folhas de *Syzygium cumini* por meio de testes *in vitro* com eritrócitos humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico e processamento vegetal

O material botânico utilizado nesse estudo foram folhas de *Syzygium cumini*, as quais foram coletadas em abril de 2015, na zona rural do município de Campina Grande-PB, Brasil (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W). O espécime vegetal foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier (Departamento de

Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB), identificado sob o número de voucher JPB 58.543.

Após a coleta do material, as folhas foram limpas e submetidas à secagem e desidratação em estufa com circulação de ar (FANEM – Modelo 330/5), a temperatura de 45°C, por um período de 14 dias alcançando a estabilização final do peso. Posteriormente, foram pulverizadas em moinho de facas (Solab Científica - Modelo SL 30) de 10 mesh.

O método de extração utilizado para obtenção do extrato foi a percolação, com agitação ocasional, realizando-se duas trocas do solvente, durante cinco dias. A proporção utilizada foi de 200g do material vegetal moído para 1000 mL de solução etanólica a 70%. O extrato foi evaporado sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40°C com 70 rpm para eliminação do solvente. Posteriormente, o extrato hidroalcoólico foi liofilizado (Liofilizador LS 3000 Terroni[®]) com temperatura de -20°C a -40°C.

Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos

Material biológico

Testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados utilizando eritrócitos humanos dos tipos A, B, AB, O, provenientes de bolsas de sangue obtidas na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/ Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB). O sangue obtido consiste naquele que seria descartado, em virtude de não ser mais passível de utilização para finalidades transfusionais.

Aspectos éticos

Uma vez que os testes de citotoxicidade *in vitro* envolveram a utilização de material biológico proveniente de seres humanos, os mesmos foram realizados de acordo com as diretrizes e normas da Resolução 466/2012 CNS. O Projeto de Pesquisa foi registrado na Plataforma Brasil e submetido para avaliação e apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade

Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, aprovado com número de CAAE: 62508416.8.0000.5187.

Concentrações testadas

As concentrações do extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *S. cumini* utilizadas neste estudo foram determinadas com base nos resultados obtidos através de estudo preliminar sobre o potencial antifúngico deste material vegetal sobre cepas clínicas e de referência de fungos do gênero *Candida* (FIGUEIRÊDO-JÚNIOR et al, 2017), através do qual o extrato demonstrou valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 31,25 µg/ mL para *C. krusei* (ATCC 6258) e para cepas clínicas de *C. albicans* (LM1) e *C. albicans* (LM3), 62,5 µg/mL para *C. glabrata* (ATCC 90030) e *C. tropicalis* (ATCC 750) e 125 µg/mL para *C. albicans* (ATCC 10231) e associação de *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030).

Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Para a realização desse ensaio, uma amostra de sangue humano foi inicialmente misturada com Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% na proporção de 1:30. Em seguida essa amostra foi centrifugada a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos para obtenção do concentrado de eritrócitos, repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Ao final, o sedimento da última centrifugação foi mais uma vez ressuspenso em NaCl 0,9%, obtendo-se uma suspensão de 0,5% de sangue.

As amostras de 0,5mL do extrato de *S. cumini* em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 2 mL da suspensão de eritrócitos obtidas conforme descrito anteriormente. Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação lenta e constante (100 rpm) e decorrido este tempo foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min, sendo a hemólise das amostras ~~fe~~ quantificada em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) através da leitura das absorbâncias em um comprimento de onda de 540nm. Uma suspensão dos

eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise) e uma suspensão dos eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% foi utilizada como controle positivo (100% de hemólise) (RANGEL et al, 1997).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos através da média $\pm$ erro padrão da média.

Avaliação da fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

As amostras de 0,5mL do extrato em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 μ g/mL) foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de uma solução de eritrócitos a 0,5% (obtidas conforme descrição anterior), e incubados por 1 hora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante.

O sedimento de eritrócitos foi ressuspenso em uma solução hipotônica de NaCl 0,24% e agitados a 100 rpm por 20 minutos, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, sendo a hemólise quantificada em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) por meio da leitura das absorbâncias de uma alíquota do sobrenadante, em um comprimento de onda de 540nm (DACIE, 2001). Uma solução de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise), enquanto que o controle positivo (100% de hemólise) consistiu em uma solução de eritrócitos adicionados a solução de NaCl 0,24%.

Os resultados foram expressos em percentual de hemólise em comparação ao grupo controle positivo. Todos experimentos foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos através da média $\pm$ erro padrão da média.

Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de espécies reativas de oxigênio

O experimento foi realizado de acordo com metodologia proposta por Bilotto et al (2012), com algumas modificações.

Amostras do extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *S. cumini* em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) foram adicionados em tubos contendo 2 mL de uma solução de eritrócitos a 0,5 % (obtida conforme descrito anteriormente), com adição de uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (40 mM). Os tubos foram incubados por 4 h a 25 ± 2°C e decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada através da leitura de uma alíquota do sobrenadante em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) a um comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al, 1997).

Amostras contendo solução de eritrócitos foram utilizadas como controle negativo. Por outro lado, o controle positivo correspondeu a solução de eritrócitos associados a solução de H₂O₂ 40 mM (100% de hemólise). Foi também utilizado um padrão contendo Hemoglobina (Hb) + H₂O₂ + Vitamina C (1000 µg/mL).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos através do percentual de hemólise em comparação ao grupo controle positivo.

Avaliação do potencial oxidante e do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

Para a investigação do potencial oxidante foi preparado inicialmente uma suspensão de eritrócitos a uma concentração de 30% em Tampão fosfato salino (PBS) (11,35g NaH₂PO₄.2H₂O; 24,36g Na₂HPO₄ e 7,18g NaCl para 1L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6.

Após a obtenção dessa suspensão, as amostras do extrato das folhas de *Syzygium cumini* nas diferentes concentrações testadas (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL) foram adicionadas a tubos contendo 2 mL da suspensão de eritrócitos a 30% em Tampão fosfato salino conforme descrito acima.

As amostras foram incubados por um período de 1 h sob agitação lenta e constante (100 rpm) a 22 ± 2°C.

Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min e a porcentagem de metahemoglobina (mHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada em espectrofotômetro (modelo GT 7220 BioPet Technologies,

Monte Alto, Brasil) em comprimentos de onda de 630nm e 540nm, respectivamente. A porcentagem de mHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina, agente oxidante utilizado como controle positivo (ARBOS et al, 2008).

Para o ensaio de investigação do potencial antioxidante, após o período de incubação de 1 h referente a etapa descrita anteriormente, foi adicionado 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina, e em seguida as suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 20 minutos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5,7g KH_2PO_4 para 1L) e a porcentagem de mHb em relação a Hb total foi quantificada através da leitura em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) a 630 nm e 540 nm, respectivamente.

O percentual de mHb formado também foi comparado com os valores obtidos para a vitamina C (20 mmol/L), agente anti-oxidante (ARBOS et al., 2008).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos através do percentual de formação de metahemoglobina em função da hemoglobina mHb (%Hb), em comparação ao grupo controle positivo (Hb + fenilhidrazina) (ARBOS et al, 2008).

Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade utilizando-se eritrócitos humanos foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0® (San Diego, CA, EUA) empregando-se o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett. Os valores foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) ou desvio padrão da média (d.p.) e considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Os resultados dos testes de avaliação do potencial hemolítico do extrato de *S. cumini* em comparação ao controle negativo (suspensão dos eritrócitos não hemolisados) estão representados na Figura 1.

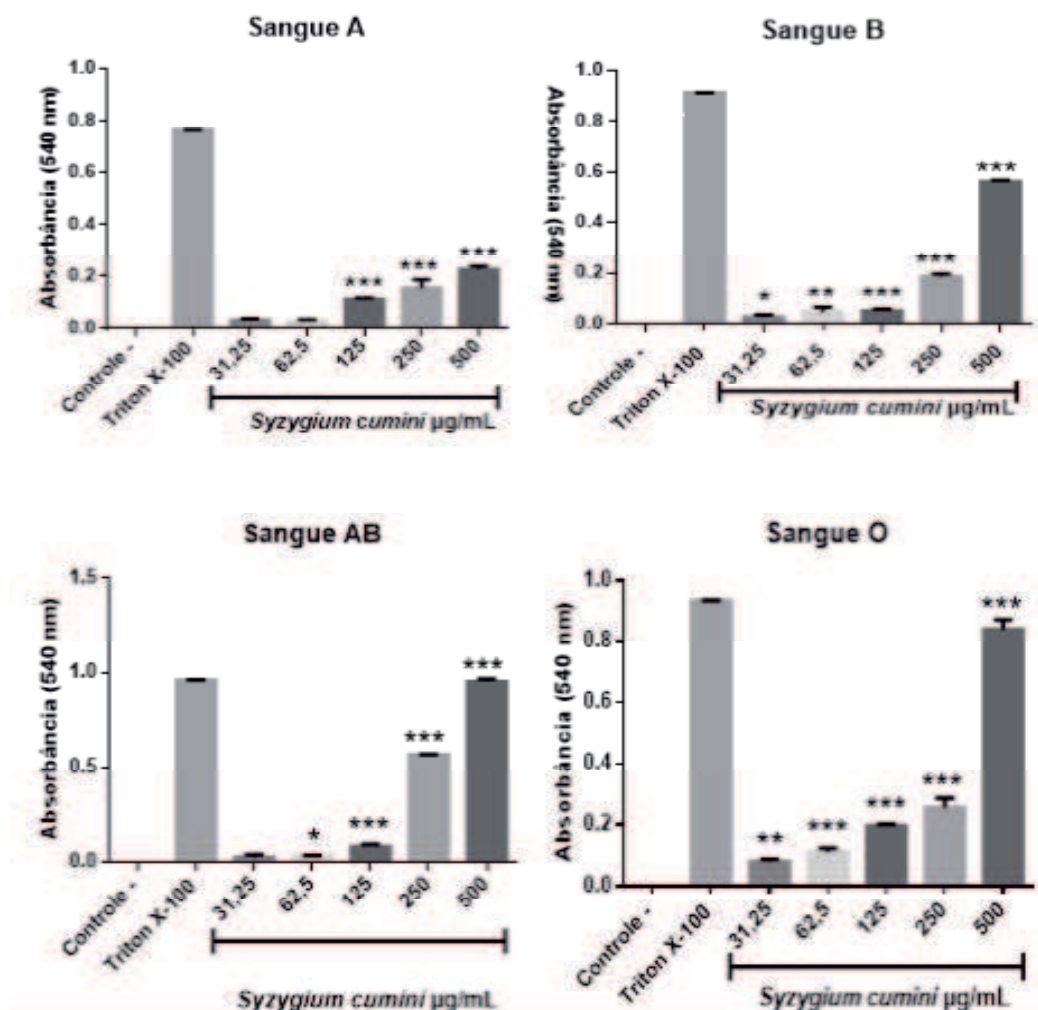


Figura 1- Efeito hemolítico induzido pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O em comparação com o controle negativo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).

Pode-se mencionar que de acordo com a Figura 1, os resultados demonstram que quando comparado ao controle negativo, o extrato de *S. cumini* foi capaz de causar diferentes percentuais de hemólise nos eritrócitos. De modo geral, verifica-se que esse efeito segue um padrão diretamente proporcional para as diferentes concentrações do extrato, constituindo um achado comum para os eritrócitos de todos os tipos sanguíneos avaliados. Entretanto, percebe-se que na maior concentração testada (500 µg/mL), sobretudo para eritrócitos dos tipos sanguíneos AB e O, o extrato foi capaz de demonstrar percentuais hemolíticos próximos aqueles causados pelo controle positivo de Triton X-100.

Quando comparado ao controle negativo, os percentuais de hemólise causados pelo extrato não demonstram diferença estatisticamente significativa, apenas na concentração de 31,25 µg/mL para os eritrócitos dos tipos sanguíneos A e AB, e na concentração de 62,5 µg/mL para os eritrócitos do tipo A.

Por outro lado, comparou-se também os percentuais de hemólise promovidos pelo extrato em relação àqueles observados pelo controle positivo (Triton X-100 a 1%, capaz de causar 100% de hemólise) (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de hemólise promovida pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O, em comparação ao controle positivo.

TIPO SANGUÍNEO	CONCENTRAÇÃO		% HEMÓLISE			
	EXTRATO	31,25 µg/mL	62,5 µg/mL	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
A		4,0	3,5	14,4	20,1	29,5
B		2,8	5,2	5,7	20,0	61,0
AB		2,5	3,1	8,4	59,0	99,1
O		8,0	11,0	23,0	27,0	89,0

De acordo com os valores encontrados, verifica-se que quando comparado aos percentuais de hemólise obtidos pelo controle positivo (Triton X-100 a 1%), o extrato também foi capaz de causar hemólise.

De modo geral, os valores dos percentuais de hemólise também seguiram um padrão diretamente proporcional, conforme a concentração testada do extrato. A única exceção ocorreu apenas frente aos eritrócitos do tipo A, que demonstram discreta inversão da ordem de 0,5% nos percentuais de hemólise nas duas menores concentrações testadas do extrato (31,25 e 62,5 µg/mL).

Os valores em percentuais de hemólise causados pelo extrato variaram, apresentando desde valores mínimos de 2,5% (para a concentração de 31,25 µg/mL) até valores equivalentes a 99,1% (para a concentração de 500 µg/mL), sendo os maiores valores evidenciados na maior concentração testada do extrato.

Comparado aos demais tipos sanguíneos, os eritrócitos do tipo sanguíneo O demonstraram os maiores percentuais de hemólise frente as menores

concentrações testadas do extrato (31,25; 62,5 e 125 µg/mL), apresentando-se como o tipo sanguíneo mais sensível frente à exposição a essas concentrações do extrato. Entretanto, nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, os eritrócitos do tipo AB demonstraram os maiores percentuais de citotoxicidade.

Já concentração do extrato de 500 µg/mL, um maior padrão de hemólise ocorreu sobretudo nos eritrócitos dos tipos AB e O, os quais apresentaram-se como os tipos sanguíneos mais sensíveis frente às maiores concentrações do extrato, evidenciando portanto, os maiores percentuais de efeitos citotóxicos.

Avaliação da fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

Frente as concentrações do extrato de *S. cumini* em que observou-se baixos percentuais hemolíticos (31,25 e 62,5 µg/mL para os eritrócitos dos tipos A e O; e 31,25; 62,5 e 125 µg/mL para os eritrócitos dos tipos B e AB), procedeu-se a realização do teste de avaliação da atividade anti-hemolítica, no sentido de investigar os efeitos do mesmo sobre a estabilidade da membrana celular de eritrócitos submetidos a situação de estresse osmótico.

A Figura 2 ilustra os resultados obtidos por meio dessa análise.

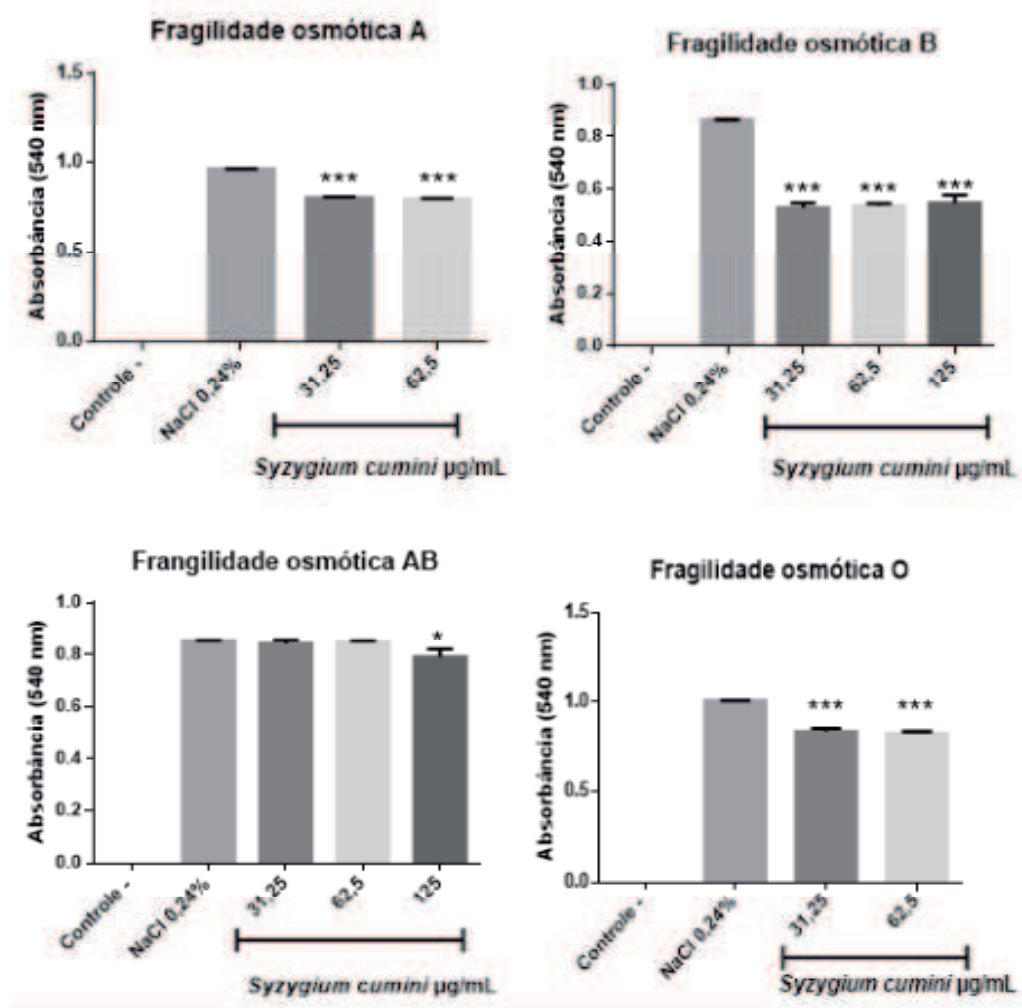


Figura 2- Atividade anti-hemolítica induzida pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O quando em solução hipotônica (NaCl 0,24 %). Os resultados foram obtidos em comparação com o controle positivo e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).

Os resultados demonstram que quando comparado ao controle positivo (NaCl 0,24%), o extrato foi capaz de causar redução nos percentuais de hemólise, exercendo menores efeitos citotóxicos sobre os eritrócitos de todos os tipos sanguíneos testados.

Esses efeitos demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) nas concentrações do extrato de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ frente a eritrócitos dos tipos A, B, O e na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ sobre eritrócitos do tipo B.

Por outro lado, dentre os eritrócitos do tipo AB, apenas aqueles expostos ao extrato na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ demonstram diferença estatisticamente

significativa, considerando-se o valor de $p < 0,05$ em relação ao percentual de hemólise causado pelo controle positivo.

Os valores dos percentuais hemolíticos causados pela exposição dos eritrócitos à solução hipotônica de NaCl 24% e pela exposição as diferentes concentrações do extrato de *Syzygium cumini* estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Percentual de hemólise promovida pelo extrato das folhas de *Syzygium cumini* sobre eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B, AB e O, após tratamento com uma solução hipotônica (NaCl, 24%).

TIPO SANGUÍNEO	CONCENTRAÇÃO EXTRATO	% HEMÓLISE		
		31,25 µg/mL	62,5 µg/mL	125 µg/mL
A		83,2	82,5	---
B		60,0	61,0	62,9
AB		98,5	99,2	92,5
O		82,0	81,0	---

(Legenda: --- Concentração não avaliada)

Considerando-se os percentuais de hemólise causado pela exposição dos eritrócitos à solução hipotônica de NaCl 24% (100% de hemólise) e o percentual hemolítico causado pela exposição dessas células a diferentes concentrações do extrato, percebe-se que quando essas células estão expostas a situações de estresse osmótico, o extrato de *S. cumini* foi capaz de causar uma redução nos percentuais de hemólise comparado ao controle positivo.

Tal redução foi observada em valores que variaram de 0,8% (para os eritrócitos do tipo AB frente a concentração de 62,5 µg/mL do extrato) até 40% (para os eritrócitos do tipo B frente a concentração de 31,25 µg/mL do extrato).

De modo geral, os eritrócitos do tipo sanguíneo B apresentaram os melhores resultados quanto ao nível de redução do percentual hemolítico induzido por estresse osmótico.

Avaliação do potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de espécies reativas de oxigênio

A avaliação do potencial antioxidante do extrato de folhas de *S. cumini* foi realizada a partir da exposição de eritrócitos humanos do tipo AB ao peróxido de hidrogênio. Os resultados obtidos através desse teste estão expressos na Figura 3.

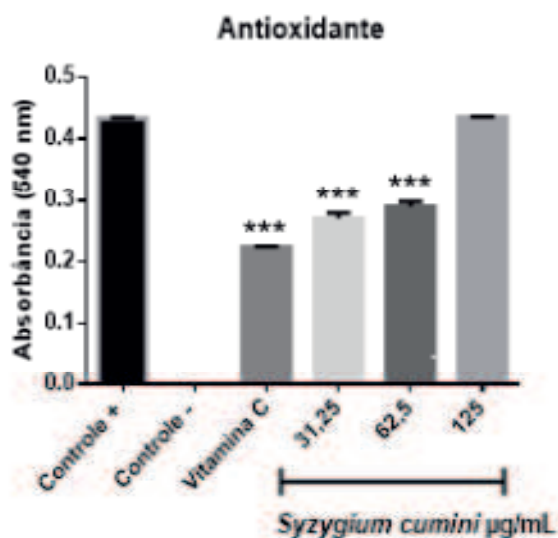


Figura 3 - Atividade antioxidante do extrato das folhas de *S. cumini* frente à hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo AB. Os resultados foram obtidos em comparação com o controle positivo e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).

De acordo com os resultados deste estudo, observa-se que a utilização do extrato de folhas de *S. cumini* nas concentrações equivalentes a 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ é capaz de provocar redução no percentual hemolítico sobre eritrócitos expostos a ação do peróxido de hidrogênio, demonstrando diferença estatisticamente significativa em relação aos percentuais de hemólise causados pelo grupo controle positivo (solução de H_2O_2).

O resultado verificado pelo extrato quando utilizado nessas concentrações demonstra efeito próximo àquele obtido através da utilização do grupo padrão representado pela utilização da vitamina C, antioxidante.

Desse modo, é possível atribuir que nas concentrações de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ o extrato exerce efeito antioxidante frente a uma situação de hemólise induzida por H_2O_2 .

Avaliação do potencial oxidante e potencial antioxidante em eritrócitos humanos na presença de fenilhidrazina

Os ensaios de avaliação do potencial oxidante e do potencial antioxidante do extrato de folhas de *S. cumini* sobre eritrócitos humanos foram avaliados através da quantificação entre os percentuais de metahemoglobina e de hemoglobina formados a partir da exposição dos eritrócitos a diferentes concentrações do extrato e a Fenilhidrazina. Para a realização desse teste, utilizou-se apenas amostra de eritrócitos do tipo sanguíneo AB. Os resultados estão expressos na Figura 4.

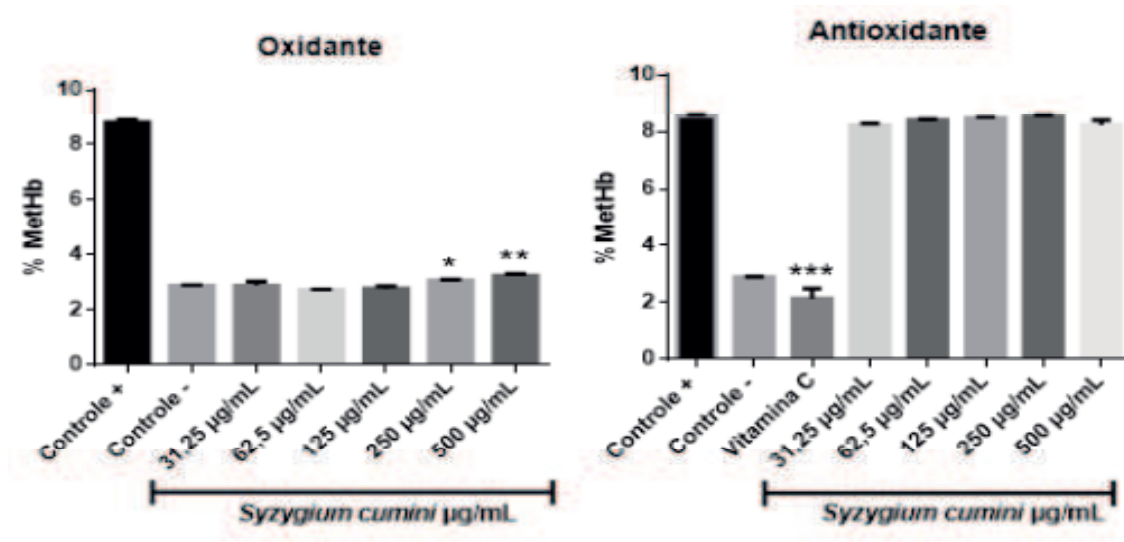


Figura 4 - Atividade oxidante e antioxidante do extrato das folhas de *S. cumini* sobre eritrócitos humanos do tipo sanguíneo AB. Os resultados estão expressos como percentual da média de formação de metahemoglobina (MetHb) em comparação ao grupo controle negativo (ensaio oxidante) e controle positivo (ensaio antioxidante). Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).

Conforme pode ser verificado através da figura 4, os resultados expressam que quando comparado ao controle negativo, o extrato é capaz de promover oxidação da hemoglobina à metehemoglobina apenas nas maiores concentrações testadas (250 µg/mL e 500 µg/mL), evidenciando, portanto que a sua utilização nas concentrações iguais ou inferiores a 125 µg/mL não induz a ocorrência de oxidação da hemoglobina nos eritrócitos.

Por outro lado, é possível observar que, em comparação aos percentuais de oxidação causados pela Fenilhidrazina, potente agente oxidante utilizado como controle positivo, o extrato não demonstra ser um forte agente oxidante, visto que os níveis de oxidação provocados por todas as concentrações desse produto vegetal demonstraram ser inferiores a aqueles causados pela Fenilhidrazina. Esses percentuais de oxidação são menores que 50% em relação aos percentuais demonstrados pelo controle positivo.

Já em relação a investigação do potencial antioxidante do extrato, os resultados expressos na figura 4 demonstram que quando comparado ao controle positivo, não houve redução estatisticamente significativa entre os níveis de formação de metehemoglobina/hemoglobina induzidos pela fenilhidrazina nos grupos em que foram testadas as diferentes concentrações do extrato.

Assim, observa-se que frente a exposição de eritrócitos à agentes oxidantes como a fenilhidrazina, o extrato não é capaz de exercer efeito protetor frente a reações oxidativas causada por esse agente oxidante.

DISCUSSÃO

considerando-se que o extrato de folhas de *S. cumini* tem demonstrado resultados promissores, sinalizando um potencial interesse frente a uma futura indicação terapêutica do mesmo (COSTA et al, 2009), a investigação de diferentes efeitos biológicos durante os estudos de bioprospecção desse material vegetal evidencia a necessidade da realização de estudos *in vitro* direcionadas à investigações de aspectos relacionados à citotoxicidade associada a seu uso.

Nessa perspectiva, investigou-se seu potencial citotóxico através do ensaio de atividade hemolítica, dada a inexistência de estudos preliminares disponíveis na literatura acerca desse ensaio frente ao extrato das folhas de *S. cumini*. Ademais, esse teste também foi empregado em virtude de sua ampla indicação e emprego já consolidado na investigação do potencial citotóxico de substâncias (BRASIL, 2012; PINTO et al, 2012; ABBASI et al, 2013; TUPE et al, 2015; MEHREEN et al, 2016; VO et al, 2016).

De modo geral, no que se refere a uma categorização do efeito hemolítico causado pelo extrato pode-se atribuir que de acordo com Rangel et al (1997), a

atividade hemolítica do extrato pode ser considerada baixa (< 40% de hemólise) para a maioria das concentrações avaliadas. Nessa perspectiva, seguindo essa classificação, exceções ocorreram para a concentração de 250 µg/mL em eritrócitos do tipo AB e para a concentração de 500 µg/mL sobre eritrócitos do tipo B, os quais demonstraram moderada atividade hemolítica (40-80% de hemólise). Por outro lado, o extrato apresentou alta atividade hemolítica (>80% de hemólise) para os eritrócitos dos tipos AB e O na maior concentração testada (500 µg/mL).

Por outro lado, com base na classificação proposta por Luíze et al (2005), esse produto vegetal é capaz de demonstrar atividade hemolítica considerada forte (>50% de hemólise) apenas nas maiores concentrações testadas (250 µg/mL para eritrócitos do tipo AB e 500 µg/mL para os eritrócitos dos tipos B, O e AB) .

Nessa perspectiva, diante dos resultados evidenciados a partir do ensaio de atividade hemolítica, pode-se atribuir que a utilização do extrato nas concentrações de 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL e 125 µg/mL equivalentes àquelas que demonstraram efeito inibitório mínimo sobre o crescimento fúngico (CIM) de cepas de *Candida* (FIGUEIRÊDO-JÚNIOR et al, 2017) é capaz de causar atividade hemolítica considerada baixa, de acordo com a classificação proposta por Rangel et al (1997). Por outro lado, levando-se em consideração a classificação de Luíze et al (2005), a utilização do extrato nessas concentrações não é capaz de causar atividade hemolítica considerada forte sobre nenhum dos tipos sanguíneos avaliados. Desse modo, pode-se atribuir que de acordo com as classificações propostas por Rangel et al (1997) e Luíze et al (2005), o extrato de folhas de *S. cumini* revela-se pouco citotóxico sobre eritrócitos, quando utilizados nessas concentrações terapêuticas, de modo que os níveis de hemólise causados nessas concentrações sugerem a possibilidade de segurança para sua utilização, contrariamente ao que seria verificado caso o extrato fosse empregado em concentrações maiores.

A constatação da ocorrência de variações nos percentuais de hemólise nos eritrócitos dos diferentes grupos sanguíneos indica que essas células demonstram diferenças nos perfis de citotoxicidade ao extrato, conforme os distintos grupos sanguíneos.

Uma vez que os tipos sanguíneos são classificados de acordo com o sistema ABO em virtude da presença (nos sangues tipos A, B e AB, inclusive com variações entre os grupos) ou ausência (no sangue tipo O) de antígenos nas suas

membranas celulares, as diferenças observadas entre os grupos sanguíneos em relação aos padrões de citotoxicidade provocados pelo extrato poderiam ser atribuídas e/ou justificadas em virtude da existência das diferenças relacionadas a essas variações antigênicas entre cada tipo celular (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; DANIELS, 2009; PAIVA et al, 2009).

Além disso, é pertinente também enfatizar que a ocorrência de efeitos biológicos como a hemólise frente a exposição de eritrócitos a extratos de plantas medicinais pode ocorrer em virtude da presença de determinados grupos de compostos químicos presentes na composição desse produto vegetal, sobretudo as saponinas, uma vez que esses compostos apresentam propriedade hemolisante (COLEMAN et al, 2010). Desse modo, a verificação da indução de diferentes percentuais hemolíticos para o extrato no presente estudo pode ser justificado em virtude da composição do mesmo, uma vez que esse grupo de compostos fitoquímicos está presente em sua constituição química, representando inclusive o grupo de compostos majoritários e possível marcador ativo para o mesmo (PEREIRA et al, 2016).

De modo complementar as investigações realizadas no teste de atividade hemolítica, a avaliação do efeito do extrato sobre a fragilidade osmótica (ou ação anti-hemolítica) também foi avaliada no presente estudo em virtude de sua ampla aceitação e empregabilidade na investigação de efeitos toxicológicos *in vitro* de substâncias, inclusive aquelas de origem vegetal (REDDY et al, 2007; HE et al, 2008; CHIKEZIE et al, 2012; WACZUK et al, 2015; DUARTE et al, 2016). A realização desse teste para o extrato de folhas de *S. cumini*, consistiu-se pertinente visto que a literatura não apresenta ainda nenhum estudo acerca da investigação desse efeito biológico utilizando esse produto vegetal, sendo essa uma análise inédita.

Assim, por meios dos resultados encontrados a partir desse ensaio pôde-se atribuir que a presença do extrato sob determinadas concentrações é capaz de exercer ligeiro efeito protetor sobre a membrana celular de eritrócitos expostos a situações osmóticas adversas (REDDY et al, 2007; HE et al, 2009; CHIKEZIE et al, 2012; WACZUK et al, 2015; DUARTE et al, 2016). Tal afirmação é corroborada a partir da observação do comportamento da membrana celular dos eritrócitos frente a presença desse produto vegetal. Assim, comparado ao grupo controle positivo, a

verificação do comportamento funcional mais estável da membrana celular dos eritrócitos expostos a ação do extrato caracteriza esse efeito protetor (CHIKEZIE et al, 2012) evidenciado a partir da constatação da redução na indução de perturbações e alterações na sua integridade, dada a diminuição no percentual de dano celular (REDDY et al, 2007; CHIKEZIE et al, 2012; DUARTE et al, 2016), fazendo com que adquiram certa resistência à lise (HE et al, 2009; WACZUK et al, 2015).

De posse dos resultados obtidos a partir dos testes de hemólise e de fragilidade osmótica pode-se afirmar que de acordo com as condições avaliadas o extrato demonstra efeitos duais sobre a membrana dos eritrócitos, sendo estes tanto de natureza indutora de danos à integridade da membrana celular, como também efeitos de natureza protetora sobre esses efeitos (HE et al, 2009).

Os dados obtidos a partir do teste de fragilidade osmótica permitiram demonstrar que a existência desses efeitos duais sobre a membrana celular podem estar relacionados a fatores como a concentração do extrato e à exposição ou não das células a condições potencialmente indutoras de estresse e desequilíbrio osmótico, sendo esses achados concordantes com estudos prévios (HE et al, 2009) envolvendo esse mesmo ensaio. Adicionalmente, diante das diferenças nos percentuais de redução dos efeitos citotóxicos frente aos eritrócitos dos diferentes tipos sanguíneos, pode-se também sugerir a possibilidade de se atribuir esses efeitos a fatores como o tipo sanguíneo, sobretudo em virtude da existência das diferenças estruturais existentes nas membranas celulares (BATISSOCO, NOVARETTI, 2003; DANIELS, 2009; PAIVA et al, 2009), conforme mencionado anteriormente.

Ademais, as investigações das atividades biológicas do extrato de folhas de *S. cumini* incluíram a investigação preliminar de seus potenciais efeitos oxidante e antioxidantes.

Estes ensaios foram realizados considerando-se a ênfase que vem sendo dada em relação a necessidade da descoberta de novas fontes de substâncias com ação antioxidante (ALVES et al, 2010; MOHAMED et al, 2013), dada a importância da indicação e uso de compostos dessa natureza mediante suplementação exógena (HARSHA; ANILAKUMAR, 2014).

Comparando a ocorrência de alterações/danos celulares através da oxidação da molécula de hemoglobina à metahemoglobina em eritrócitos expostos a estresse oxidativo (ARBOS et al 2008), pôde-se verificar que quando utilizados nas menores concentrações o extrato demonstra efeitos antioxidantes sobre eritrócitos expostos ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. Por outro lado, a exposição das células a agentes oxidantes mais potentes como a fenilhidrazina não demonstrou resultados que permitam estimar a existência desses efeitos.

Assim, a evidenciação da capacidade antioxidante do extrato frente ao peróxido de hidrogênio simula situações fisiológicas comuns, uma vez que o peróxido de hidrogênio juntamente com outras espécies reativas de oxigênio, são produzidas continuamente a partir do metabolismo, exercendo caráter tóxico e reativo sobre estruturas e componentes celulares (HALLIWELL, 1997; BJAPAI et al, 2005; HARSHA, ANILAKUMAR, 2014; MOHAMED et al, 2013). Assim, os achados desse ensaio são importantes uma vez que apontam que a utilização do extrato vegetal em baixas concentrações pode demonstrar benefícios à saúde, através de ação antioxidante sobre células expostas a estresse oxidativo mediado pela ação de compostos como o peróxido de hidrogênio, demonstrando ainda efeitos antifúngicos sobre espécies de *Candida* (FIGUEIRÊDO-JÚNIOR et al, 2017).

A verificação desses efeitos antioxidantes protetores para o extrato de folhas de *S. cumini* pôde ser associada a presença de compostos fenólicos, flavonoides e saponinas na composição desse produto vegetal (PEREIRA et al, 2016), sendo esses efeitos corroborados através das evidências disponíveis na literatura, uma vez que fitoquímicos como os compostos fenólicos (BAJPAL et al, 2005; SOOBRATTEE et al, 2005; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; RENGASAMY et al, 2012; MOHAMED et al, 2013; HARSHA, ANILAKUMAR, 2014), flavonoides (RAVI et al, 2004; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; MOHAMED et al, 2013; HARSHA, ANILAKUMAR, 2014) e saponinas (AIYELAAGBE; OSAMUDIAMEN, 2009; GOWRI; VASANTHA, 2010) são agentes capazes de exercer ação antioxidante.

Além disso, a identificação por meio de cromatografia gasosa associada a espectrômetro de massas em relação a presença de compostos como o 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil- no extrato avaliado no presente estudo (FIGUEIRÊDO-JÚNIOR et al, 2017) pode corroborar esses achados, uma vez que

essa substância pertencente à classe dos flavonoides (TEOH; DON; UJANG, 2011; TEOH, DON, 2015), apresenta ação antioxidante (ČECHOVSKÁ et al, 2011; TEOH; DON; UJANG, 2011; YU et al, 2013; PENG; DON, 2013), dentre outras atividades biológicas.

Os ensaios de citotoxicidade empregados no presente estudo sobre eritrócitos humanos foram conduzidos em razão da facilidade de realização e de sua aplicabilidade e pertinência no sentido de permitir investigar e predizer de modo eficaz a capacidade do extrato em exercer ou não efeitos citotóxicos sobre estruturas e componentes celulares como membranas celulares (BRASIL, 2012; PINTO et al, 2012; VO et al, 2016) e molécula de hemoglobina (ARBOS et al, 2008). Os resultados encontrados nesse estudo permitem complementar os achados já disponíveis acerca da investigação de efeitos do extrato de folhas de *S. cumini* sobre modelos celulares de queratinócitos humanos e macrófagos murinos (PEREIRA et al, 2016), contribuindo para a investigação longitudinal acerca da bioprospecção desse produto vegetal.

Além disso, é pertinente salientar que avaliação desses parâmetros de citotoxicidade mostram-se imperativos durante a investigação e triagem dos produtos vegetais, no sentido de fornecer informações preliminares acerca da eficácia e segurança associada ao seu uso, predizendo a possibilidade ou não de sua indicação para formulação e utilização terapêutica (NOLDIN et al, 2003; VARANDA, 2006; MIGLIATO et al, 2007; WACZUK et al, 2015).

Nesse sentido, é necessário enfatizar que frente à perspectivas de uma futura indicação e utilização clínica do extrato de folhas de *S. cumini*, investigações adicionais precisam ser realizadas visando a avaliar outros efeitos biológicos associados ao seu uso, sobretudo aqueles relacionados à toxicidade *in vivo*.

CONCLUSÃO

Frente a ensaios de citotoxicidade em eritrócitos humanos, o extrato de folhas de *S. cumini* apresenta baixa atividade hemolítica quando utilizado em concentrações ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, nessas mesmas concentrações o extrato promove redução nos percentuais hemolíticos sobre hemólise induzida por estresse osmótico, apresentando portanto, efeitos protetores celulares e não sendo capaz de

induzir a ocorrência de oxidação nos eritrócitos. Adicionalmente, em menores concentrações o extrato apresenta efeitos antioxidantes frente a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, embora não demonstre a mesma ação antioxidante frente a fenilhidrazina. Em virtude dos resultados evidenciados quanto à citotoxicidade do extrato de folhas de *S. cumini*, sugere-se a necessidade de investigações adicionais, sobretudo aquelas relativas à toxicidade *in vivo*, visando a avaliar se o mesmo apresenta segurança e possibilidade para indicação e utilização terapêutica.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não declaram nenhum conflito de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de auxílio financeiro que tornou viável a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abbasi, M.A., Ur-Rehman, A., Ahmad, V.U., Riaz, T. & Khaid, F. (2013). Evaluation of antibacterial, antifungal, enzyme inhibition and hemolytic activities of *Caryopteris odorata* fractions. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(12), 9-15. doi: 10.7897/2230-8407.041203
- Aiyelaagbe, O.O., & Osamudiamen P.M. (2009). Phytochemical screening for active compounds in *Mangifera indica* leaves from Ibadan, Oyo State. *Plant Sciences Research*, 2 (1), 11-13.
- Albuquerque, U.P. & Hanazaki, N. (2006). As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(Supl.), 678-689. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500015>
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J.P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202-2210. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

Arbos K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A. & A.M. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28(7), 457-463.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2008.04.004>

Ayyanamar, M. & Subash-Babu, P. (2012). *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 240-246. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60050-1.

Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S.K. & Prakash, D. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(4), 287-291.

<http://dx.doi.org/10.1080/09637480500146606>

Baliga, M.S., Fernandes, S., Thilakchand, K.R., D'souza, P. & Rao, S. (2013). Scientific Validation of the Antidiabetic Effects of *Syzygium jambolanum* DC (Black Plum), a Traditional Medicinal Plant of India. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 19 (3), 191-197. <https://doi.org/10.1089/acm.2011.0752>

Batissoco, A.C., & Novaretti, M.C.Z. (2003). Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 25(1), 47-58. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842003000100008>

Bilto, Y.Y., Suboh, S., Aburjai, T. & Abdalla, S. (2012). Structure-activity relationships regarding the antioxidant effects of the flavonoids on human erythrocytes. *Natural Science*, 4(9) 740-747. doi: 10.4236/ns.2012.49098

BRASIL (2006). *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS*, Brasília.

BRASIL (2012). *Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos*. (2nd ed.), Brasília.

Čechovská, L., Cejpek, K., Konečný, M. & Velíšek, J. (2011). On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. *European Food Research and Technology*, 233(3), 367-376. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1527-4>

Chagas, V.T., França, L.M., Malik, S. & Paes, A.M.A. (2015). *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 6(259) 1-8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00259>

Chikezie, P.C., Akuwudike, A.R. & Chikezie, C.M. (2012). Membrane stability and methaemoglobin content of human erythrocytes incubated in aqueous leaf extract of *Nicotiana tabacum* product. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(4), 56-61. <https://doi.org/10.5530/ax.2012.4.10>

Coleman, J.J., Okoli, I., Tegos, G.P., Holson, E.B., Wagner, F.F., Hamblin, M.R. & Mylonakis, E. (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chemical Biology*, 5(3),321-332. doi: 10.1021/cb900243b

Costa, A.C.B.P., Pereira, C.A., Freire, F., Junqueira, J.C.& Jorge, A.O.C. (2009) Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. *Revista de Odontologia da UNESP*, 38(2), 111-116.

Dacie, J. & Lewis, S. M. (2001). *Practical Haematology*. (9th ed.). London: Churchill Livingstone.

Daniels, G. (2009). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Human Genetics*, 126(6), 729-742. doi:10.1007/s00439-009-0738-2

Duarte, A.E., Waczuk, E.P., Roversi, K., Silva, M.A.P., Barros, L.M., Cunha, F.A.B., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Boligon, A.A., Ademiluyi, A.O., Kamdem, J.P., Rocha, J.B.T.& Burger, M.E. (2016). Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. *Molecules*, 21(1), 1-15. doi:10.3390/molecules21010002

Figueirêdo-Júnior, E.C. (2017) *Prospecção dos efeitos antifúngico, citotóxico e antioxidante do extrato de Syzygium cumini (LINN.) SKEEL*. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

Gowri, S.S. & Vasantha, K. (2010) Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1569-1573.

Gutteridge, J. & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: molecules, medicines and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>

Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55(1 Pt 2):S44-S49.

Harsha, S.N. & Anilakumar, K.R. (2014) In vitro free radical scavenging and DNA damage protective property of *Coriandrum sativum* L. leaves extract. *Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1533-1539. doi: 10.1007/s13197-012-0648-5.

He, J., Lin, J., Li, J., Zhang, J.H., Sun, X.M. & Zeng, C.M. (2009). Dual effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on human red blood cells. *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*, 104(2), 138-44. doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00354.x

Luize, P.S., Tiuman, T.S., Morello, L. G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Mello, J.C.P. & Nakamura, C.V. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1), 85-94. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322005000100010>

Mehreen, A., Waheed, M., Liaqat, I., & Arshad, N. (2016). Phytochemical, antimicrobial, and toxicological evaluation of traditional herbs used to treat sore throat. *BioMed Research International*, 2016, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8503426>

Migliato, K.F., Baby, A.R., Zague, V., Velasco, M.V.R., Corrêa, M.A., Sacramento, L.V.S. & Salgado, H.R.N. (2006). Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta farmacêutica bonaerense*, 25(2), 310-314.

Migliato, K.F., Moreira, R.R.D., Mello, J.C.P., Sacramento, L.V.S., Corrêa, M.A. & Salgado, H.R.N. (2007) Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 94-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100018>

Mohamed, A.A., Ali, S.I. & El-Baz, F.K. (2013). Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. *PLoS ONE*, 8(4), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060269>

Noldin, V.F., Cechinel Filho, V., Monache, F.D., Benassi, J.C., Christmann, I.L., Pedrosa, R.C. & Yunes, R.A.. (2003). Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova*, 26(3), 331-334. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300008>

Paiva S.G., Sabino, A.P., Carvalho, M.G., Ribeiro, D.D., Gomes, K.B., Santos, M.S., Oliveira, M.S., Lages, G.G., Dusse, L.M. & Fernandes, A.P. (2009). Polymorphisms in exons 6 and 7 of the ABO locus and their association with venous thrombosis in young Brazilian patients. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 20(2), 122-128. doi: 10.1097/MBC.0b013e328323da99.

Peng, T.Y. & Don, M.M. (2013) Antifungal Activity of *in-vitro* Grown *Earliella Scabrosa*, a Malaysian Fungus on Selected Wood-degrading Fungi of Rubberwood. *Journal of Physical Science*, 24(2), 21–33.

Pereira, J.V., Freires, I.A., Castilho, A.R., da Cunha, M.G., Alves, H.S. & Rosalen, P.L. (2016). Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2312-2319. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2016.1155629>

Pinto, D.S., Duarte, F.M., Costa, J.I.V., Almeida Filho, G.G., Alves, H.S., Chaves, M.C.O. & Pessôa, H.L.F. (2012). Antibacterial and Hemolytic Activities from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). *Anti-Infective Agents*, 10(1), 1-5.

- Rangel, M., Malpezzi, E.L., Susini, S.M. & De Freitas, J.C. (1997). Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*, 35(2)305-309. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00148-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00148-1)
- Ravi, K., Ramachandran, B. & Subramanian, S. (2004). Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin induced diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(8), 1212-1217. <http://doi.org/10.1248/bpb.27.1212>
- Reddy, C.S.S.S., Subramanyam, M.V., Vani, R., Asha Devi, S. (2007). In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicology In Vitro*, 21(8), 1355-1364. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>
- Rengasamy, R.R., Rajasekaran, A., Micheline, G.D. & Perumal, A. (2012). Antioxidant activity of seagrasses of the Mandapam coast, India. *Pharmaceutical Biology*, 50(2), 182-187. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2011.591807>
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-ramma, A., Aruoma, O.I. & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Srivastava, S. & Chandra, D. (2013). Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2084–2093. doi:10.1002/jsfa.6111
- Teoh, Y.P., Don, M.M. & Ujang, S. (2011). Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and GC-MS study by *Pycnoporus sanguineus*. *BioResources*, 6(3), 2719-2731.
- Teoh, Y.P. & Don, M.M. (2015). Mycelia Growth and Production of Total Flavonoids and 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- by *Schizophyllum commune* Using a Bubble Column Bioreactor Considering Aeration Effect and Mass Transfer Study. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*, 28(4), 553–559. doi: 10.15255/CABEQ.2014.2024
- Tupe, R.S., Kulkarni, A., Adeshara, K., Shaikh, S., Shah, N. & Jadhav, A. (2015). *Syzygium jambolanum* and *Cephalandra indica* homeopathic preparations inhibit albumin glycation and protect erythrocytes: an in vitro study. *Homeopathy*, 104(3), 197-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.homp.2015.02.009>
- Varanda, E. A. (2009). Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de ciências Farmaceuticas basica e aplicada*, 27(1), 1-7.
- Vo, N.N.Q., Fukushima, E.O. & Muranaka, T. (2016). Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogeni. *Journal of Natural Medicines*, 71(1), 50-58. doi:10.1007/s11418-016-1026-9

Waczuk, E.P., Kamdem, J.P., Abolaji, A.O., Meinerz, D.F., Bueno, D.C., Gonzaga, T.K.S.N., Dorow, T.S.C., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Rocha, J.B.T. & Ávila, D.S. (2015). *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. *Toxicology Research*, 4(3), 739-748. doi: 10.1039/C4TX00122B

Yu, X., Zhao, M., Liu, F., Zeng, S. & Hu, J. (2013) Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a Strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. *Food Research International*, 51(1), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.044>

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A análise fitoquímica do extrato das folhas de *S. cumini* identificou um total de 34 compostos, sendo 2,2-Dimetoxibutano; 4H-Piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-; 5-Hidroximetilfurfural; 2,4-Di-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furan-3-ona e Ácido propanodioico, dimetil éster as substâncias majoritárias encontradas;
- O extrato das folhas de *S. cumini* apresentou potencial antimicrobiano sobre todas as cepas de *Candida* testadas, com efeito considerado de forte a moderado, mediante os resultados evidenciados pela resposta microbiana;
- O extrato de *S. cumini* apresenta atividade antifúngica com ação fungistática sobre todas as cepas de *Candida* avaliadas, sendo esse efeito mais significativo quando a *C. albicans* foi exposta a sua ação por um período de oito horas;
- Nas concentrações que demonstram efeito inibitório mínimo sobre o crescimento fúngico de cepas de *Candida*, o extrato de *S. cumini* apresenta baixa atividade hemolítica, exercendo efeito protetor sobre a hemólise induzida por estresse osmótico;
- Em menores concentrações inibitórias de crescimento microbiano, o extrato de folhas de *S. cumini* apresenta efeito antioxidante frente a estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, não sendo capaz de demonstrar a mesma ação em relação a fenilhidrazina;
- O extrato de *S. cumini* não induz a ocorrência de oxidação nos eritrócitos em concentrações que demonstram efeito inibitório sobre o crescimento de cepas do gênero *Candida*.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.A. et al. Evaluation of antibacterial, antifungal, enzyme inhibition and hemolytic activities of *Caryopteris odorata* fractions. **Int Res J Pharm**, v. 4, n. 12, p. 9-15, 2013.
- AIYELAAGBE, O.O.; OSAMUDIAMEN P.M. Phytochemical screening for active compounds in *Mangifera indica* leaves from Ibadan, Oyo State. **Plant Sci Res**, v. 2, n. 1, p. 11-13, 2009.
- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev bras farmacogn**, v. 16 supl., p. 678-689, 2006.
- ALLIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001
- ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, C.T. et al. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. **J Infect**, v. 69, n. 4, p. 396-407, 2014.
- ANDES, D. et al. Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance *in vivo*: fluconazole and *Candida albicans*, **Antimicrob Agents Chemother**, v.50,n.7,p.2374-2383,2006.
- APARICIO, R. M. et al. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 39, n. 5, p. 1063-1067, 2005.
- ARBOS, K.A. et al. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutr Res**, v, 28, n. 7, p. 457-463, 2008.
- AYYANAMAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.
- BAJPAI, M. et al. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. **Int J Food Sci Nutr**, v. 56, n. 4, p. 287–291, 2005.
- BALIGA, M.S. et al. Scientific validation of the antidiabetic effects of *Syzygium jambolanum* DC (Black Plum), a traditional medicinal plant of India. **J Altern Complement Med**, v. 19, n. 3, p. 191–197, 2013.
- BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M.C.Z. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003 .

BENSADOUN, R.J. et al. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update 2011. **Support Care Cancer**, v. 19, n. 6, p. 737-744, 2011.

BILTO, Y.Y. et al. Structure-activity relationships regarding the antioxidant effects of the flavonoids on human erythrocytes. **Natural Science**, v. 4, n. 9, p. 740-747, 2012.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce pre hemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicol Lett**, v. 152, n. 1, p. 73-84, 2004.

BRANDÃO, R. et al. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug Chemical Toxicol**, v. 28, n. 4, p. 397-407, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2ª Edição, 74p., 2012.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, Brasília, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**, Brasília, 2006.

CAMPOS, S.C et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev Bras PI Med**, v. 18, n. 1, supl. I, p. 373-382, 2016.

CANTÓN, E, et al. *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 7, p. 3108–3111, 2009.

CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O. et al. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Rev Bras PI Med**, v. 17, n. 4, supl. III, p. 1091-1096, 2015.

CAVALCANTI, Y.W. et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. **Biofouling**, v. 31, n. 1, p. 27-38, 2015.

_____. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. **Biofouling**, v. 32, n. 2, p. 123-134, 2016.

_____. Salivary pellicles equalise surfaces' charges and modulate the virulence of *Candida albicans* biofilm. **Arch Oral Biol**, v. 28, n. 66, p. 129-140, 2016.

ČECHOVSKÁ, L. et al. On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. **Eur Food Res Technol**, v.233,n.3,p.367–376,2011.

CHAGAS, V.T. et al. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Front Pharmacol**, v. 6, n. 259, p. 1-8, 2015.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J Ethnopharmacol**, v. 91, n. 1, p. 105–108, 2004.

CHIKEZIE, P.C.; AKUWUDIKE, A.R.; CHIKEZIE, C.M. Membrane stability and methaemoglobin content of human erythrocytes incubated in aqueous leaf extract of *Nicotiana tabacum* product. **Free Radic Antioxid**, v. 2, n. 4, p. 56-61, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3**. Wayne: Pensylvânia, 2008. 59p.

COLEMAN, J.J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chem Biol**, v. 5, n. 3, p. 321–332, 2010.

COSTA, A.C.B.P. et al. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Rev Odontol UNESP**, v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. London, Churchill Livingstone, 2001.

DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Hum Genet**, v. 126, n. 6, p. 729-742, 2009.

DE CASTRO, R.D. et al. Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Rev Ciênc Méd Biol**, v. 12, n. 2, p.149-156, 2013.

DIAZ, P.I. et al. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel *in vitro* mucosal model. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 620-632, 2012.

DOI, A.M. et al. Epidemiology and microbiologic characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

DORNAS, W.C. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

DUARTE, A.E. et al. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1-15, 2016.

EVENSEN, N.A; BRAUN, P.C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation, **Can J Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1033-1039, 2009.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FREIRES, I.A. et al. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p.1-13, 2014.

GOMES, P.N. et al. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. **Arch Oral Biol**, v.56, n.11, p.1274-1281, 2011.

GOW, N.A. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 2, p.112-122, 2011.

GOWRI, S.S.; VASANTHA, K. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. **Int J of PharmTech Res**, v. 2, n. 2, p. 1569-1573, 2010.

GULATI, M.; NOBILE, C.J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infect**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines and myths. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nut Rev**, v. 55, n. 1, p. 44–52, 1997.

HARSHA, S.N.; ANILAKUMAR, K.R. *In vitro* free radical scavenging and DNA damage protective property of *Coriandrum sativum* L. leaves extract. **J Food Sci Technol**, v.51, n. 8, p. 1533-1539, 2014.

HE, J. et al. Dual effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on human red blood cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 2, p. 138-144, 2009.

HÖFLING, J.F. et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Braz J Biol**, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

KARYGIANNI, L. et al. Natural antimicrobials and oral microorganisms: A systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. **Front Microbiol**, v. 6, n. 1529, p. 1-17, 2016.

KLEPSE, M.E. et al. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 6, p. 1392–1395, 1997.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO., K.V.B. Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an *in vitro* study. **Elixir Appl. Botany**, v. 40, p. 5534-5537, 2011.

JENNIFER, S.; BOEHMEB, A.; SETZER, N. Biological activities of essential oils from Monteverde. **Nat Prod Commun**, v. 12, n. 2, p. 1212-1219, 2007.

LOGUERCIO, A.P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LUIZE, P.S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* . **Rev Bras Cienc Farm**, v. 41, n. 1, p. 85–94, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002..

MARTINS, C.H. et al. *Candida/Candida* biofilms. First description of dual species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. **Fungal Biol**, v. 120, n. 4, p. 530-537, 2016.

McCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 2000.

MEHREEN, A. et al. Phytochemical, antimicrobial, and toxicological evaluation of traditional herbs used to treat sore throat. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

MIGLIATO, K.F. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2006.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MOHAMED, A.A. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of kaff maryam (*Anastatica hierochuntica*) and doum palm (*Hyphaene thebaica*). **Grasas Y Aceites**, v. 61, n. 1, p. 67–75, 2010.

MOHAMED, A.A. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2013.

MORALES, G. et al. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, v.13,n.4,p.790-794,2008.

MUADCHEINGKA, T.; TANTIVITAYAKUL, P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. **Arch Oral Biol**, v. 60, n. 6, p. 894-901, 2015.

MUKHERJEE, A.; RAJASEKARAN, C. *In-vitro* hemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 5, p. 1160-1162, 2010.

NOLDIN, V.F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OLIVEIRA, F.Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, G.F. et al. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Braz J Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 381-384, 2007.

OLIVEIRA, V.M.A. et al. *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amaz**, v. 39, n. 4, p. 973-980, 2009.

PAIVA, S.G. et al. Polymorphisms in exons 6 and 7 of the ABO locus and their association with venous thrombosis in young Brazilian patients. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.20, n.2, p.122-128, 2009.

PELEG, A.Y. HOGAN, D.A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial–fungal Interactions. **Nat Rev Microbiol**, v.8, n. 5, p. 340-349, 2010.

PENG, T.Y.; DON, M.M. Antifungal Activity of *in-vitro* Grown *Earliella Scabrosa*, a Malaysian Fungus on Selected Wood-degrading Fungi of Rubberwood. **Journal of Physical Science**, v.24, n.2, p. 21–33,2013.

PEREIRA, C.A. et al. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 85, n. 1, p. 66-72, 2016.

PEREIRA, J.V. et al. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharm Biol**, v. 54, n. 10, p. 2312-2319, 2016.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p.146-152, 2012

PINTO, D.S. et al. Antibacterial and Hemolytic Activities from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Anti-Infective Agents**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2012.

RANGEL, M. et al. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

RAVI, K. et al. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin induced diabetic rats. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 8, p. 1212–1217, 2004.

REDDY, C.S.S.S. et al. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. **Toxicol in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1355–1364, 2007.

RENGASAMY, R.R. et al. Antioxidant activity of seagrasses of the Mandapam coast, India. **Pharm Biol**, v. 50, n. 2, p. 182-187, 2012.

RIGOBELLO, E.S. et al. Identificação de compostos orgânicos em lixiviados de aterro sanitário municipal por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 794-800, 2015.

RODRIGUES, C.F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 5, p. 673–688, 2014.

SALAH, N. et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. **Arch Biochem Biophys**, v. 322, n. 2, p. 339–346, 1995.

SANTOS, J.D. et al. Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-albicans species: a study of microbial interactions. **Braz Oral Res**, v. 30, n. 23, p. 1-8, 2016.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v.35. n.4, p.275-280,2004.

SAVASTANO, C. et al. *Candida glabrata* among *Candida spp.* from environmental health practitioners of a Brazilian hospital. **Braz J Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 367-372, 2016.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes -- by plant extracts with antiplasmodial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SHRIKANTA, A.; KUMAR, A.; GOVINDASWAMY, V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. **J Food Sci Techno**, v. 52, n. 1, p. 383-390, 2015.

SIDDIQUI, Z.N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.17, n.2, p.237–243,2013.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 5, p. 421-427, 2011.

SILVA-ROCHA, W.P. et al. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, n.6, p. 1-15, 2015.

SOOBRAATTEE, M.A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutat Res**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

SOUZAT.M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **J. Sci. Food Agric**, v. 93, n. 9, p. 2084–2093, 2013.

TEHIN, Z.M.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 8, p. 672-680, 2006.

TEHIN, Z.M. et al. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 467–475, 2009.

TEOH, Y.P., DON, M.M.; UJANG, S. Media selection for mycelia growth, antifungal activity against wood-degrading fungi, and GC-MS study by *Pycnoporus sanguineus*. **BioResources**, v.6, n.3, p.2719-2731, 2011.

TEOH, Y.P.; DON, M.M. Mycelia Growth and Production of Total Flavonoids and 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl- by *Schizophyllum commune* Using a Bubble Column Bioreactor Considering Aeration Effect and Mass Transfer Study. **Chem. Biochem. Eng. Q**, v.28, n.4, p.553–559, 2015.

TUPE, R.S. et al. *Syzygium jambolanum* and *Cephalandra indica* homeopathic preparations inhibit albumin glycation and protect erythrocytes: an *in vitro* study. **Homeopathy**, v.104, n.3, p.197-204, 2015.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VIERA, T.I. et al. *In vitro* antibacterial and non-stick activity of extracts from leaves of *Psidium guineense* Sw. and *Syzygium cumini* (L.) Skeels on oral microorganisms. **Rev Gaúcha Odontol**, v. 60, n. 3, p. 359-365, 2012.

VISSERS, M.C.M.; CARR, A.C.; CHAPMAN, A.L.P. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. **Biochem J**, v. 330, p. 131-138, 1998.

VO, N.N.Q.; FUKUSHIMA, E.O.; MURANAKA, T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogeni. **J Nat Med**, v. 71, n. 1, p. 50-58, 2016.

WACZUK, E.P. et al. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicol. Res**, v. 4, n. 3, p. 739-748, 2015.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **J Oral Microbiol**, v. 3, p. 57-71, 2011.

XU, H. et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 2, p. 214-231, 2014.

YU, X. et al. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a Strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. **Food Research International**, v.51, n.1, p.397–403, 2013.

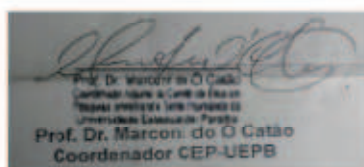
ZOMORODIAN, K. et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture related stomatitis in complete denture wearers. **Med Mycol**, v. 49, n. 2, p. 208-211, 2011.

ANEXOS

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO
SERES HUMANOS-UEPB

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEP/UEPB

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.

**PARECER DO RELATOR: 23**

Número do CAAE emitido pela PLATAFORMA BRASIL: 62508416.8.0000.5187

Data da 1ª relatoria: 13 de dezembro de 2016

Data da 2ª relatoria: 22/03/2017

Pesquisadora Responsável: Jozinete Vieira Pereira

Apresentação do Projeto: O projeto é intitulado: "Prospecção dos Efeitos antifúngico, citotóxico e antioxidante do extrato de *Syzygium cumini* (LINN.) SKEEL". É um projeto de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar o potencial antifúngico, antibiofilme, antioxidante e citotóxico do extrato hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeel sobre espécies de *Candida*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Uma vez que a Resolução 466/2012 afirma que toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados, pode-se afirmar que essa pesquisa envolverá um risco mínimo aos participantes, uma vez que envolverá apenas uma participação indireta dos mesmos (tendo em vista que o material biológico (eritrócitos) a ser utilizado NÃO será obtido diretamente dos participantes, mas sim de forma indireta, a partir das bolsas de sangue presentes na unidade transfusional

do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), conforme mencionado na metodologia desse projeto de pesquisa. Desse modo, tendo elegido a coleta e utilização do material biológico (eritrócitos) obtidos indiretamente dos participantes, prevemos então a possibilidade de minimização ao máximo dos possíveis riscos para os participantes da pesquisa. Da mesma forma, são praticamente nulas as possibilidades de danos imediatos ou posteriores em decorrência da participação nessa pesquisa, já que os eritrócitos utilizados não serão obtidos exclusivamente para a realização dessa pesquisa, mas sim para fins de utilização na unidade transfusional, salientando-se mais uma vez que os eritrócitos que serão utilizados na análise de citotoxicidade serão amostras que seriam descartadas pela unidade transfusional, não sendo, portanto, mais passíveis de utilização. Mencionados esses aspectos, reafirma-se e justifica-se os benefícios esperados com a realização da pesquisa, dentre os quais está a possível indicação para utilização e formulação dessa espécie vegetal para utilização terapêutica para a prevenção e/ou tratamento de candidose bucal na clínica odontológica. Por fim, salientamos que a despeito das informações elencadas, caso a pesquisadora responsável perceba a existência de qualquer risco ou danos significativos ao participante da pesquisa não previsto, será comunicado ao Sistema CEP/CONEP, conforme recomendações da Resolução 466/2012 para avaliação necessidade de adequação ou suspensão do estudo. Espera-se com esse estudo, que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeel apresente atividade antifúngica sobre espécies de *Candida* e que o mesmo não apresente efeitos citotóxicos e genotóxicos. Desse modo, resultados satisfatórios poderão servir de base para a realização de outras investigações futuras, objetivando-se ao final chegar a resultados que possam indicar a utilização e formulação dessa espécie vegetal para a prevenção e/ou tratamento de candidose bucal na clínica odontológica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O Projeto é extremamente relevante. Está bem escrito. Com uma excelente fundamentação teórica. Apresenta três hipóteses e desfecho primário. A metodologia está bem escrita, apresentando de forma detalhada o que será desenvolvido *in vitro* e *in vivo*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foi apresentada toda a documentação obrigatória referente ao desenvolvimento do estudo.

Recomendações: O referido estudo encontra-se em sua segunda apreciação ética, por tratar-se projeto de pesquisa, encaminhado para apreciação ética com a finalidade de

elaboração e desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, reapresentado com as recomendações solicitadas, não há novas recomendações. Podendo seguir seu cronograma de atividades.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do parecer: Aprovado

ANEXO B- NORMAS DA REVISTA ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY



ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.3
• Guide for Authors	p.4



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

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief:

G.B. Proctor, Salivary Research Unit, Dental Institute, King's College London, Floor 17 Guy's Tower, London, SE1 9RT, UK

S.W. Cadden, University of Dundee, Dundee, UK

Associate Editors:

F. Lundy, Queen's University, Belfast

G. Murray, University of Sydney, Australia

G. N. Belibasakis, Karolinska Institute, Sweden

Editorial Board:

G.H. Carpenter, London, UK

M. Cole, Georgetown, USA

B. Dale-Crunk, Seattle, USA

C. Dawes, Manitoba, Canada

M.J. Dixon, Manchester, UK

C.W.I. Douglas, Sheffield, UK

X. Duan, Xi'an, Shaanxi

J.A. Garlick, Stony Brook, USA

D. Grenier, Quebec, Canada

S. Herring, Seattle, USA

T. Itota, Hyogo, Japan

M. Jontell, Göteborg, Sweden

R. Jordan, San Francisco, USA

H. Larjava, Vancouver, Canada

M. MacDougall, San Antonio, USA

S. Marshall, San Francisco, USA

J.R. Martinez, Bethesda, USA

C.P. McArthur, Kansas City, USA

C. McCulloch, Toronto, Canada

M. McCullough, Melbourne, Australia

M. McKee, Montreal, Canada

A.M. Moursi, Columbus, USA

M. Narhi, Turku, Finland

J. Richman, Vancouver, Canada

J.Y. Ro, Maryland, USA

C. Robinson, Leeds, UK

T. Salo, Oulu, Finland

L.P. Samaranayake, Queensland, Australia

B.J. Sessle, Toronto, Canada

P.T. Sharpe, London, UK

A.J. Smith, Birmingham, UK

P. Stashenko, Boston, USA

D. Steinberg, Jerusalem, Israel

H. Suda, Tokyo, Japan

A.L. Symons, Brisbane, Australia

T. Takata, Hiroshima, Japan

S. Tanase, Gifu, Japan

K. Tanne, Hiroshima, Japan

H.W. van der Glas, Utrecht, The Netherlands

L. Villanueva, Paris, France

L.J. Walsh, Brisbane, Australia

T. Wright, North Carolina, USA

T. Zelles, Budapest, Hungary

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
- paleodontology

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

For further information, visit our [Support Center](#).

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) 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 or 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 lower-case 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, DEAE-cellulose, 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 and shading in table cells.

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 plug-ins 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. <https://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

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used

for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

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 $P<0.0005$.

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.