



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

RENNALY DE FREITAS LIMA

***Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENNAN: PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES
ANTICANDIDA, ANTIBIOFILME, ANTITUMORAL E CITOTÓXICA**

CAMPINA GRANDE,

2018

RENNALY DE FREITAS LIMA

***Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENNAN: PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES
ANTICANDIDA, ANTIBIOFILME, ANTITUMORAL E CITOTÓXICA**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa

CAMPINA GRANDE,

2018

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.

L732a Lima, Rennaly de Freitas.
Anadenanthera colubrina (vell.) Brenan [manuscrito] : perfil químico e atividades anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica / Rennaly de Freitas Lima. - 2018.
111 p. : il. colorido.
Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2018.
"Orientação : Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa , Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Fitoterapia. 2. Análise química. 3. Produtos com ação antimicrobiana. 4. Testes de toxicidade. I. Título
21. ed. CDD 615.321

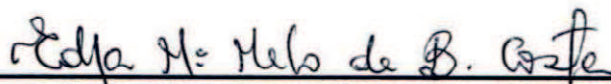
RENNALY DE FREITAS LIMA

***Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENAN: PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES
ANTICANDIDA, ANTIBIOFILME, ANTITUMORAL E CITOTÓXICA**

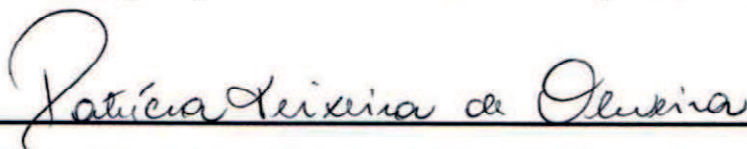
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Aprovado em 31/08/2018

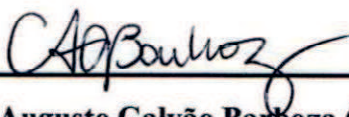
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientadora – UEPB)



Profa. Dra. Patrícia Teixeira de Oliveira (Titular Externa – UFRN)



Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza (Titular Externo – UFRN)



Prof. Dr. Manuel Antonio Górdon-Nuñez (Titular Interno – UEPB)



Profa. Dra. Ana Marly Araújo Maia Amorim (Titular Interna – UEPB)

À minha orientadora, Edja Costa,
Por todo o companheirismo e ajuda,
Pelas boas risadas e conselhos,
Por toda a oportunidade de crescimento,
Dedico-lhe este trabalho.

Ao meu filho, Lucas,
Que, ainda em meu ventre,
Já me ensinou tanto sobre o amor,
Dedico-lhe este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, bênçãos e livramentos em meus caminhos. Por se fazer presente diariamente em minha vida, fortalecendo e engrandecendo sempre a minha fé.

À minha orientadora, Edja Costa, por ter acreditado e confiado novamente em mim. Por todo o companheirismo durante esta jornada. Por todos os ensinamentos. Por ser exemplo de força e luz. Pela paciência e empenho fundamentais para a concretização deste trabalho. Meu eterno respeito e admiração por sua serenidade, humildade e dom de ensinar.

Aos meus pais, Rosinaldo e Zilmarte, pelo incansável apoio nesta longa caminhada. Pela generosidade em permitir que a minha formação fosse sempre prioridade em suas vidas. Por todo o amor e carinho. Por serem exemplo e referência de dedicação, superação, união e companheirismo. Pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu esposo, Daniel Campos, pelo apoio e companheirismo diários. Por preencher minha vida com tanto amor. Pelas renúncias. Por nunca desistir de nós. Por nossa família. Por sonhar comigo os meus sonhos e apoiá-los incondicionalmente.

À minha irmã, Gislayny Lima, por sempre me acompanhar em minhas jornadas. Por todo o apoio e amizade. Por ter me presenteado com Artur, meu sobrinho querido, fonte de amor puro e sincero.

À minha querida amiga, Carolina Medeiros, pelo companheirismo e amizade. Por ter contribuído diretamente para a realização deste trabalho. Por estar sempre presente em minha vida. Por ser refúgio de paz e afeto.

Aos meus amigos de grupo de pesquisa, Diego Romário, Paolla Raimundo, Priscila Guimarães, Victor Vasconcelos, Érika Ponchet, Arella Brito e Tereza Vieira, por toda a ajuda na execução deste trabalho. Pela amizade e boas risadas. Alguns hoje trilham por novos caminhos, mas o carinho será eterno.

Ao professor Carlos Augusto Barboza, por nos auxiliar na execução deste trabalho. Pela disponibilidade e gentileza constantes.

Ao professor Ricardo de Albuquerque Júnior, pela disponibilidade e apoio nas análises químicas.

Aos professores Wilton Lopes e Josivandro Silva, por nos receber no laboratório de química da Estação Experimental de Tratamento de Água e Esgotos (Extrabes) e nos apoiar na execução deste trabalho.

Ao professor Josean Fachine, pela colaboração nesta pesquisa ao nos permitir acesso ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

À Joanda Paolla Raimundo, por sua disponibilidade, auxílio e apoio intelectual nas análises químicas. Por toda a atenção dispensada.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, pela notória importância em meu crescimento e pelas oportunidades concedidas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, agradeço por todos os conhecimentos compartilhados e por terem participado desta importante etapa da minha vida.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e sua equipe, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTI), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Educação

(MEC), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual da Paraíba, através do PROCAD, pelos auxílios financeiros concedidos, tornando possível a realização deste trabalho.

Por fim, a todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta conquista. Sou e sempre serei eternamente grata.

Lima RF. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan: Perfil Químico e Atividades Anticandida, Antibiofilme, Antitumoral e Citotóxica [tese]. Campina Grande: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba; 2018.

RESUMO

Introdução: Estudos sobre as propriedades biológicas de extratos vegetais são importantes para o desenvolvimento de novas formulações terapêuticas de origem natural. **Objetivo:** Este estudo investigou o perfil químico e as atividades anticandida, antibiofilme, antitumoral e toxicidade celular do extrato hidroalcoólico da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Materiais e Métodos:** A composição química foi investigada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Para as análises antimicrobianas, foram realizados ensaios de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), com e sem sorbitol, e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para análise da atividade antibiofilme, foram testadas duas concentrações do extrato (500 µg/mL e 1000 µg/mL) sobre biofilme de *C. albicans* e posterior avaliação morfológica em microscópio óptico invertido e de fluorescência. Foi avaliada a atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações sobre linhagens de células humanas tumorais e não-tumorais através do método da Suforrodamina B. Os testes sobre fibroblastos e pré-osteoblastos foram realizados através do ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. **Resultados:** O extrato da *A. colubrina* revelou presença de flavonoides, triterpenos, esteroides e ácidos fenólicos. Apresentou forte atividade antifúngica sobre as cepas padrão e moderada atividade para as cepas clínicas. Na presença do sorbitol, a CIM foi igual ou maior que 2000 µg/mL. O extrato apresentou, também, atividade antibiofilme, com evidente redução do número de UFC/mL e alterações morfológicas. Em relação à atividade antitumoral, apresentou efeito citostático inespecífico, com redução na proliferação celular para todas as linhagens tumorais testadas e queratinócitos, sem evidências de efeito citocida até a concentração de 250 µg/mL. A fração diclorometano:metanol apresentou efeito citocida apenas sobre as linhagens PC-3, NCI-H460 e NCI/ADR-RES. Não foi verificado efeito citotóxico do extrato até as concentrações de 62,5 µg/mL frente aos macrófagos, 60 µg/mL para fibroblastos e 90 µg/mL para pré-osteoblastos. **Conclusões:** O extrato da *A. colubrina* revela predominância de compostos fenólicos, com expressivas atividades anticandida e antibiofilme, resultantes da provável interação com a parede celular da *C. albicans*. Apresenta baixa toxicidade sobre linhagens de células humanas tumorais e não-tumorais, com efeito citocida sobre células tumorais, através da sua fração diclorometano:metanol.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia. Análise química. Produtos com ação antimicrobiana. Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais. Testes de toxicidade.

Lima RF. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan: Chemical Profile and Antifungal, Antibiofilm, Antitumoral Cytotoxic Activities [tese]. Campina Grande: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba; 2018.

ABSTRACT

Introduction: Studies on the biological properties of plant extracts are important for new natural therapeutic formulations development. **Objective:** This study investigated the chemical profile and antifungal, antibiofilm, antitumoral and cytotoxic activities of the hydroalcoholic extract of the *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan bark. **Materials and Methods:** The chemical composition was investigated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometer (GC-MS). In the antimicrobial analyzes, microdilution assays were carried out in broth for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination, with and without sorbitol, and Minimum Fungicidal Concentration (CFM). For the antibiofilm activity analysis two concentrations of the extract (500 µg/mL and 1000 µg/mL) on *C. albicans* biofilm were tested and posterior morphological evaluation in both inverted optical and fluorescence microscopy. The crude extract and fractions antiproliferative activity, on human tumor cell lines and non-tumor cells, were evaluated by the Suforrodamine B method. The tests on fibroblasts and pre-osteoblasts were evaluated. carried out by the MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. **Results:** The *A. colubrina* extract revealed the presence of flavonoids, triterpenes, steroids and phenolic acids. It had strong antifungal activity on the standard strains and moderate activity for clinical strains. In the presence of sorbitol, the MIC was equal to or greater than 2000 µg/mL. The extract also presented antibiofilm activity, with evident reduction in the number of CFU/mL and morphological alterations. In relation to the antitumor activity, it presented a non-specific cytostatic effect, with a reduction in cell proliferation for all tested tumor lines and keratinocytes, with no evidence of cytotoxic effect up to 250 µg/mL. The dichloromethane:methanol fraction showed a cytotoxic effect on the PC-3, NCI-H460 and NCI/ADR-RES. No cytotoxic effect of the extract was observed up to the concentrations of 62.5 µg/mL in the macrophages, 60 µg/mL for fibroblasts and 90 µg/mL for pre-osteoblasts. **Conclusions:** The *A. colubrina* extract reveals predominance of phenolic compounds, with significant antifungal activity against *Candida* and antibiofilm action, resulting from the probable interaction with the cell wall of *C. albicans*. It presents low toxicity on human tumor cell lines and non-tumor cells, with cytotoxic effect on tumor cells, through its dichloromethane:methanol fraction.

KEY WORDS: Phytotherapy. Chemical analysis. Antimicrobial agents. Antitumor agents. Toxicity tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência metodológica do estudo.

Figura 2. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

Figura 3. Caule da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

PLANO DE ANÁLISE I

Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (280 nm) identificados por CLAE.

Figura 2. Viabilidade celular de diferentes espécies de *Candida albicans* organizadas em biofilme, após exposição às concentrações de 500 e 1000 µg/mL do extrato da *A. colubrina*.

Figura 3. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* ATCC 10231 com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 3(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL- Figura 3(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 3(c), e 1000µg/mL – Figura (d).

Figura 4. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* ATCC 90028 com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 4(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL- Figura 4(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 4(c), e 1000µg/mL - Figura 4(d).

Figura 5. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* MYA 2876 com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 5(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 5(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 5(c), e 1000µg/mL - Figura 5(d).

Figura 6. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 01) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 6(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 6(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 6(c), e 1000µg/mL - Figura 6(d).

Figura 7. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 02) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 7(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 7(b). *C. albicans* tratada

com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 7(c), e 1000µg/mL - Figura 7(d).

Figura 8. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 03) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 8(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 8(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 8(c), e 1000µg/mL - Figura 8(d).

Figura 9. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 04) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 9(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 9(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 9(c), e 1000µg/mL - Figura 9(d).

Figura 10. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* ATCC 10231 com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 10(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 10(b) e 1000µg/mL - Figura 10(c).

Figura 11. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* ATCC 90028 com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 11(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 11(b) e 1000µg/mL - Figura 11(c).

Figura 12. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* MYA 2876 com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 12(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 12(b) e 1000µg/mL - Figura 12(c).

Figura 13. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 01) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 13(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 13(b) e 1000µg/mL - Figura 13(c).

Figura 14. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 02) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 14(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 14(b) e 1000µg/mL - Figura 14(c).

Figura 15. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 03) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 15(a). *C. albicans*

tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 15(b) e 1000µg/mL - Figura 15(c).

Figura 16. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 04) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 16(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 16(b) e 1000µg/mL - Figura 16(c).

PLANO DE ANÁLISE II

Figura 1. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição ao quimioterápico Doxorrubicina (controle positivo).

Figura 2. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição ao extrato bruto da *A. colubrina*.

Figura 3. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração diclorometano:metanol do extrato da *A. colubrina*.

Figura 4. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração metanólica do extrato da *A. colubrina*.

Figura 5: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração hidrometanólica do extrato da *A. colubrina*.

Figura 6. Distribuição do percentual médio de viabilidade celular de linhagem de macrófagos RAW 264.7 de acordo com a concentração do extrato da *A. colubrina*.

Figura 7. Distribuição do percentual médio de viabilidade celular de linhagem de fibroblastos NIH3T3 de acordo com a concentração do extrato da *A. colubrina*. *(p<0,01)

Figura 8. Distribuição do percentual médio de viabilidade celular de linhagem de pré-osteoblastos MC3T3-E1 de acordo com a concentração do extrato da *A. colubrina*. *(p<0,01)

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Linhagens celulares utilizadas nos testes antiproliferativos.

PLANO DE ANÁLISE I

Tabela 1. Constituintes químicos identificados no extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan através da análise por CG-EM.

Tabela 2. Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM), na ausência e na presença do sorbitol, e Fungicida Mínima (CFM) do extrato da *A. colubrina*, de acordo com a cepa de *Candida albicans*.

PLANO DE ANÁLISE II

Tabela 1. Valores de GI_{50} (*Growth Inhibition 50* – concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) do extrato da *A. colubrina* e de suas frações sobre cultura de células humanas tumorais e não-tumoral.

LISTA DE SIGLAS

ACAM	Arruda Câmara
AP	Aspartil Protease
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Gás carbônico
DAD	<i>Diode array detector</i> (Detector de arranjo de diodos)
DMSO	Dimetilsufóxido de Sódio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
eV	Eletrovolts
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GI ₅₀	<i>Growth Inhibition 50</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MEC	Ministério da Educação
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
m/z	Relação massa/carga
NaCl	Cloreto de Sódio
NaSO ₄	Sulfato de Sódio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Para Análise
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGO	Programa de Pós-graduação em Odontologia

PROCAD	Programa Nacional de Cooperação Acadêmica
PRPGP	Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
PTFE	Politetrafluoretileno
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAP	<i>Secreted aspartyl protease</i> (Aspartil Protease Secretada)
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TMS	Trimetilsilano
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	23
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	24
<u>PLANO DE ANÁLISE I</u>	25
4.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO.....	25
4.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
4.3.2 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	25
4.3.2.1 Preparo da Amostra.....	25
4.3.2.2 Análise Cromatográfica.....	26
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	26
4.4.1 Microrganismos	26
4.4.2 Meios de Cultura	27
4.4.3 Preparo do Inóculo	27
4.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Microdiluição	27
4.4.5 Leitura dos Resultados da CIM	27
4.4.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	28
4.5 ANÁLISE DA AÇÃO DA <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan NA PAREDE CELULAR DA <i>C. albicans</i>	28
4.5.1 Ensaio com Sorbitol	28
4.6 TESTE DE INIBIÇÃO DO BIOFILME.....	28
4.6.1 Substrato de Adesão de Biofilme	28
4.6.2 Preparo de Inóculo	28
4.6.3 Formação da Película de Saliva nos Substratos	29
4.6.4 Ensaio do Biofilme	29
4.6.5 Protocolo de Tratamento	29

4.6.6 Quantificação de Células Viáveis do Biofilme	29
4.7 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	29
4.7.1 Preparo do Inóculo	29
4.7.2 Preparo das Amostras	30
4.7.3 Microscópio de Fluorescência	30
4.7.4 Microscópio Invertido	30
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<u>PLANO DE ANÁLISE II</u>	30
4.9 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS.....	30
4.10 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR.....	32
4.10.1 Avaliação da Citotoxicidade sobre a Viabilidade Celular de Cultura de Células de Macrófagos RAW 264.7	33
4.10.2 Avaliação da Citotoxicidade sobre a Viabilidade Celular de Cultura de Células de Fibroblastos NIH3T3 e Pré-Osteoblastos MC3T3- E1	33
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS	35
5.1 PLANO DE ANÁLISE I.....	35
5.2 PLANO DE ANÁLISE II.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	
ANEXO A – Normas do periódico Journal of Medical Microbiology	
ANEXO B – Normas do periódico Journal of Applied Oral Science	

1 INTRODUÇÃO

Considerando os recursos naturais do nosso país como fonte sustentável de novas drogas e o largo interesse pelo uso de medicamentos de origem natural, estudos sobre as propriedades bioativas de plantas medicinais são relevantes para a saúde pública, uma vez que podem constituir ou subsidiar alternativas economicamente viáveis e eficazes para a prevenção ou tratamento de doenças.

O Brasil apresenta a maior biodiversidade de flora do planeta, onde muitas espécies vegetais são utilizadas pela população para fins medicinais (ALEXANDRE et al., 2005; JOLY et al., 2011; ADAM et al., 2018; LAZARINI et al., 2018). Partindo-se do princípio do uso medicinal, destaca-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, por representar uma das plantas mais comuns na medicina popular do nordeste do Brasil. É utilizada para tratar problemas respiratórios e inflamatórios, bem como para cura de diarreia, bronquite, gripe e odontalgias (MONTEIRO et al., 2006; AGRA et al., 2007; AGRA et al., 2008).

Este trabalho faz parte de um projeto estruturante, em que se avaliou inicialmente o potencial antimicrobiano do extrato da casca da *A. colubrina* sobre *Candida albicans* (ATCC 18804), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Nessa triagem inicial foi observada forte atividade apenas para a *C. albicans*, com concentração inibitória mínima (CIM) igual a 31,25 µg/mL. A partir deste resultado, foi investigada se a partição do extrato potencializava essa atividade, sendo constatada melhor atividade para a fração acetato de etila, com valor da CIM igual à do extrato. Ainda nessa fase inicial, foi analisada a sua atividade antiproliferativa sobre linhagens de células tumorais, cujos resultados indicaram um perfil citostático (LIMA et al., 2014).

Diante desses resultados, identificou-se a necessidade de avançar nas análises das propriedades bioativas do extrato da *A. colubrina*, incluindo a caracterização do seu perfil químico, avaliação das suas atividades anticandida e antibiofilme, incluindo cepas padrão de *C. albicans* e isolados clínicos recentes de candidose oral, além da análise de viabilidade celular em linhagens de macrófagos, fibroblastos e osteoblastos. Foram testadas, também, diferentes frações do extrato com o intuito de verificar uma possível potencialização da sua atividade antiproliferativa sobre células tumorais humanas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O Brasil é amplamente conhecido por possuir uma enorme biodiversidade, abrigando aproximadamente 22% das espécies mundiais em seu território, onde a maioria das plantas nativas permanece cientificamente desconhecida em termos de composição química e atividade biológica (JOLY et al., 2011; LAZARINI et al., 2018). A triagem química e farmacológica é fundamental para a avaliação do potencial terapêutico das plantas medicinais, assim como a caracterização das suas propriedades, para uso correto, seguro e eficaz (ALEXANDRE et al., 2005; ADAM et al., 2018).

Diversas plantas do bioma Caatinga, ecossistema do nordeste brasileiro marcado por uma longa estação seca, têm sido amplamente utilizadas pela população devido às suas supostas propriedades medicinais (SILVA et al., 2013). Este bioma é visto como uma fonte atrativa de moléculas bioativas, resultantes das variações ambientais extremas, relacionadas à sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, temperatura e altitude. Esses fatores são importantes na síntese dos metabólitos secundários como flavonoides, taninos e outros polifenóis, responsáveis pela bioatividade das plantas (KROYMANN, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012; ARAUJO et al., 2014).

A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Leguminosae - Mimosoideae), conhecida popularmente como angico, constitui uma das plantas desse bioma. É popularmente empregada no tratamento de gripe, asma, bronquite, tosse, anemia, difteria, gastrite e distúrbios inflamatórios (MONTEIRO et al., 2006; AGRA et al., 2008; CARTAXO et al., 2010). Pode ser encontrada, também, no nordeste e noroeste da Argentina, sudeste e sudoeste da Bolívia e na região sul do Equador (SOLDATI; ALBUQUERQUE, 2010).

O extrato da *A. colubrina* é caracterizado pela presença de componentes bioativos, representados principalmente por compostos fenólicos (ARAÚJO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017; MOTA et al., 2017). Esses compostos possuem comprovada atividade antimicrobiana contra algumas espécies de bactérias e fungos (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; LIMA et al., 2014; ARAÚJO et al., 2017), além de atividade antioxidante (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2015).

Os resultados prévios da atividade antimicrobiana do extrato da casca da *A. colubrina* (LIMA et al., 2014; NUNES et al., 2015; ROCHA et al., 2017; SILVA, 2017) conduziram o delineamento deste estudo, que tem como um dos enfoques a sua atividade anticandida. Este direcionamento tem relevância clínica, uma vez que a candidose constitui uma das infecções mais prevalentes da cavidade oral (BONDARYK et al., 2013; RASTEIRO et al., 2014;

MIRANDA-CADENA et al., 2018). Nas últimas décadas, houve um aumento significativo na incidência de todas as formas de candidose, observando-se aumento nos episódios de infecções recorrentes. Essa exposição intermitente tem propiciado a seleção contínua de cepas resistentes à terapia antifúngica. Observa-se que nas duas últimas décadas houve aumento significativo da resistência de espécies de *Candida* aos antifúngicos disponíveis (LUKASZUK; KRAJEWSKA-KULAKA; KULAK, 2017). Esse surgimento de cepas resistentes a drogas individuais ou grupos inteiros de antifúngicos alopáticos constitui, de fato, um problema de saúde, o que justifica o desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento (PFALLER et al., 1998; TSAI et al., 2006; BEN-AMI et al., 2016; SANGLARD, 2016; ZAIDI et al., 2016; ALGHAMDI et al., 2018).

A resistência microbiana é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o maior perigo no tratamento de doenças infecciosas, por tornar o tratamento mais difícil e dispendioso. O risco de seleção de cepas resistentes aos medicamentos é favorecido pela baixa adesão do paciente ao tratamento, medicamentos de baixa qualidade e as práticas de prescrição irracionais (CARS; HEDIN; HEDDINI, 2011; PIEREN; TIGGES, 2012).

Em relação a candidose, diferentes espécies de *Candida* podem estar associadas (CORONADO-CASTELLOTE; JIMENEZ-SORIANO, 2013), no entanto, a *Candida albicans* é a espécie mais comumente isolada, especialmente, em pacientes imunossuprimidos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; RASTEIRO et al., 2014). A *C. albicans* dispõe de diferentes fatores de patogenicidade, incluindo a secreção das aspartil proteases (AP), fosfolipases, expressão de adesinas de superfície e a capacidade de crescer como hifas (GOW et al., 2011). O seu crescimento na forma de hifas a protege da fagocitose, facilita a sua invasão nas superfícies epiteliais do hospedeiro e organização na forma de biofilme (CAVALCANTI et al., 2015). A formação de hifas pode representar um mecanismo de defesa da *C. albicans* e não necessariamente um aumento da sua patogenicidade (KUMAMOTO, 2005).

A organização dos microrganismos em forma de biofilme pode constituir um mecanismo de resistência aos antifúngicos, em função das alterações no pH, aumento da adesão à célula hospedeira, secreção de enzimas proteolíticas, comutação fenotípica e transição morfológica, cuja organização compromete diretamente as estratégias de prevenção e tratamento da infecção (MARTINS et al., 2014). Diante deste cenário, os produtos naturais vêm demonstrando potencial de serem uma alternativa, sejam administrados sozinhos ou em combinação com outras medicações, para combater infecções fúngicas (BANDARA et al., 2017).

Em outra vertente, diversos compostos bioativos e produtos naturais derivados de plantas, também, estão sendo intensamente investigados sobre seu potencial de prevenção e tratamento do câncer (SENAWONG et al., 2013). As altas taxas de incidência de câncer têm incentivado o interesse de pesquisadores no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e na descoberta de fármacos com melhor atividade e menores efeitos adversos (MELO et al., 2018). Além disso, a quimioterapia, estratégia comum de tratamento para o câncer avançado e metastático, apresenta problemas em sua administração, tais como custos elevados, desenvolvimento de resistência e efeitos colaterais negativos, evidenciando limitações no uso clínico e tornando-se uma preocupação para os países em desenvolvimento (KUMNERDKHONKAEN et al., 2018).

A *A. colubrina*, por possuir atividade antioxidante (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2015), demonstra potencial de ação antitumoral, através da redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SUCHAL et al., 2016). ROS e radicais livres são gerados em organismos vivos durante processos metabólicos do tipo aeróbio, sendo importante a utilização de compostos ricos em substâncias antioxidantes para reduzir seus efeitos negativos (SÁNCHEZ, 2002; TRIANA; CARVAJAL, 2013; GRANATO et al., 2015). Em estudo inicial, observou-se efeito citostático inespecífico do extrato da casca da *A. colubrina* sobre diversas linhagens de células tumorais (LIMA et al., 2014). A fim de potencializar a atividade da *A. colubrina*, foi sugerido o fracionamento do extrato bruto, com o objetivo de concentrar os possíveis compostos ativos.

Para justificar a aplicabilidade de um composto natural, deve ser definida baixa citotoxicidade às células humanas não-tumorais, visando potencializar o tratamento sem danificar os tecidos normais (CARVALHO et al., 2018). É evidente a importância biológica de substâncias que demonstrem baixa toxicidade sobre linhagens de queratinócitos, macrófagos, fibroblastos e pré-osteoblastos. Os queratinócitos humanos representam a primeira linha de defesa contra antígenos ambientais, capazes de proteger a pele da colonização e infecção microbiana exacerbada (FIRAT et al., 2014; FENINI et al., 2018). Macrófagos são células imunes mieloides, estrategicamente posicionadas em todos os tecidos do corpo, onde fagocitam células mortas, detritos e material estranho, além de mediar processos inflamatórios (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Os fibroblastos são as principais células produtoras de colágeno e, portanto, participam ativamente do processo de reparo tecidual, sendo os principais componentes do tecido conjuntivo denso (CHARI et al., 2016). E, por fim, os osteoblastos são responsáveis pela formação de proteínas da matriz óssea e indução da mineralização óssea (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). A avaliação citotóxica de qualquer novo produto a ser

utilizado futuramente em seres humanos constitui-se como etapa crucial para a avaliação de potenciais riscos e alterações metabólicas (RODEIRO et al., 2006).

Considerando os recursos naturais do nosso país como fonte sustentável de novas drogas e o largo interesse pelo uso de medicamentos de origem natural, estudos sobre as propriedades biológicas de extratos vegetais são importantes para as ciências da saúde e podem constituir alternativas economicamente viáveis e eficazes para o tratamento das doenças, como a candidose e o câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico e as atividades anticandida, antibiofilme, antitumoral e citotóxica da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Plano de Análise I:

- Identificar o perfil cromatográfico e os principais compostos orgânicos presentes no extrato bruto da *A. colubrina*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato vegetal, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) frente a *Candida albicans*;
- Analisar a ação do extrato sobre a parede celular da *C. albicans*;
- Verificar a ação do extrato na inibição do biofilme de *C. albicans*;
- Analisar a morfologia da *C. albicans* após o tratamento com o extrato da *A. colubrina*.

Plano de Análise II:

- Determinar a atividade antiproliferativa do extrato bruto e suas frações sobre células de linhagens tumorais;
- Verificar a interferência do extrato da *A. colubrina* na viabilidade celular em cultura de células de queratinócitos (HaCat), macrófagos (RAW 264.7), fibroblastos (NIH3T3) e pré-osteoblastos (MC3T3-E1).

4 METODOLOGIA

Segue abaixo fluxograma com a sequência metodológica do presente estudo.

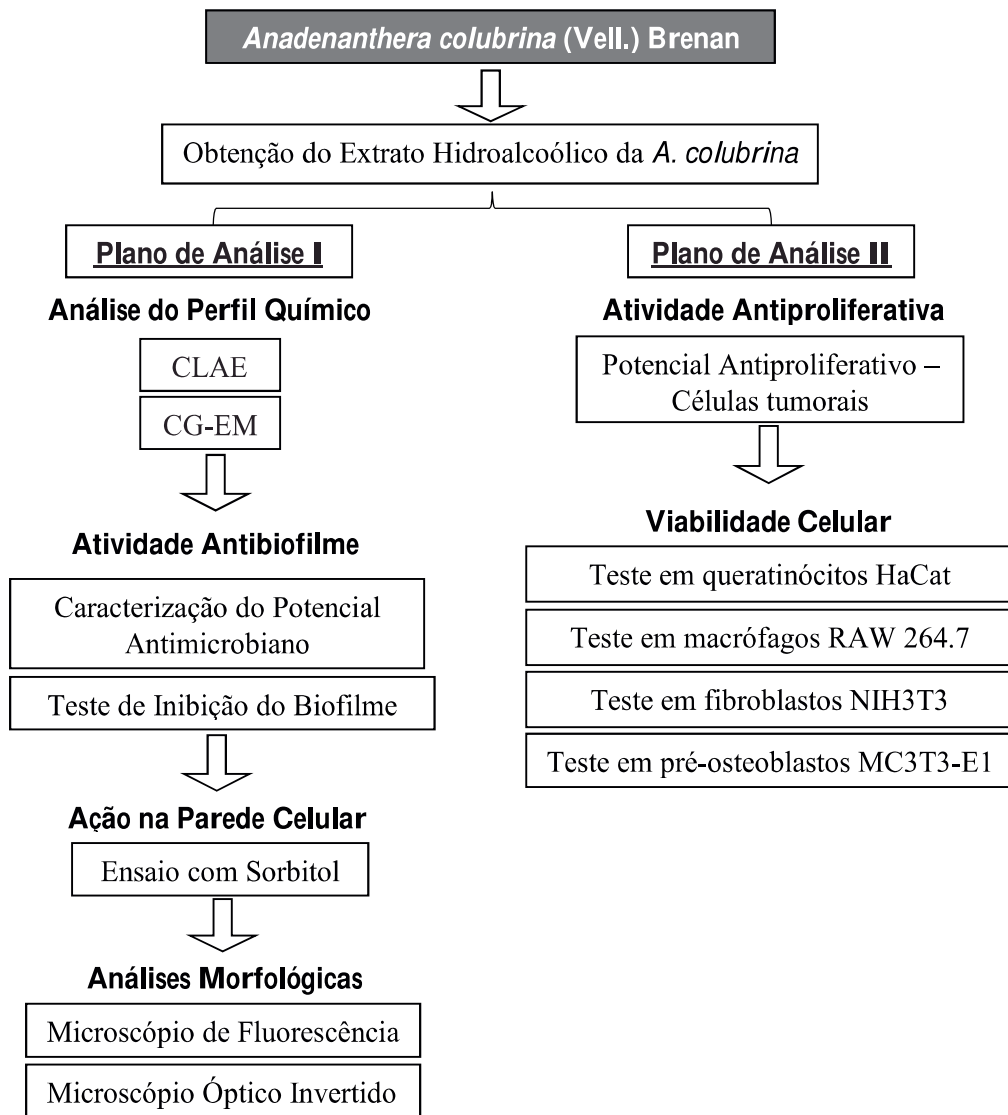


Figura 1. Sequência metodológica do estudo.

4.1 MATERIAL VEGETAL

A planta foi coletada na região do semiárido paraibano, na Serra de Bodocongó, município de Queimadas (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W), na meso região da Borborema e microrregião do Cariri Oriental, no mês de setembro de 2011. O espécime testemunho da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Figuras 2 e 3) encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba (n° 667/ACAM).



Figura 2. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan



Figura 3. Caule da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

O estudo foi realizado na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP), Campinas, São Paulo, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte e no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Aracaju, Sergipe. Este trabalho integra o projeto realizado em parceria com a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), por meio do Convênio Federal Casadinho/Procad N° 552561/201108 do CNPq/MCT e Capes/MEC.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Foi obtido o extrato hidroalcoólico a 80% da casca da planta, através de maceração por 48 horas, utilizando-se a proporção de 10mg da planta para 25mL de álcool etílico a 80% (CARVALHO et al., 2011). Foram realizadas três filtrações e, em seguida, evaporação à vácuo e liofilização. O rendimento obtido foi de 31,7%.

PLANO DE ANÁLISE I

4.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO

4.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato da *A. colubrina* foi diluído com metanol (Grau HPLC) até a concentração de 0,5 mg/mL. A solução extrativa obtida foi submetida a banho de ultrassom por 10 minutos. Antes das análises por CLAE, a solução foi filtrada em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm.

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Shimadzu®), equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A, um forno para coluna CTO-20A, e um detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp (DAD) acoplados a uma interface CBM-20A. A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna C18 de 150x4,6 mm (5 µm tamanho de partícula). A taxa de fluxo utilizada foi de 1 mL/min e o volume de injeção da amostra de 20 µL. O método analítico empregou um sistema de gradiente de eluição utilizando como fase móvel (B) metanol / (A) ácido acético (0,5 %) em água milli-q. O sistema de eluição iniciou com 5% de B durante 2 minutos, 5 – 10% de B durante 2 – 5 minutos, 10 – 30% de B durante 5 – 10 minutos, 30 – 33% de B durante 10 – 20 minutos, 33 – 35% de B durante 20 – 25 minutos, 35 – 100% de B durante 25 – 35 minutos, finalizando a análise. Os cromatogramas obtidos foram analisados com comprimento de onda de 280 nm (detector de arranjo de diodos).

A identificação dos compostos foi realizada através da co-injeção de substâncias padrões, baseando-se no seu espectro de absorção (UV) e no tempo de retenção. Ácido caféico (C₉H₈O₄), ácido gálico (C₇H₆O₅) e (+)-catequina (C₁₅H₁₄O₆) foram obtidos da Sigma-Aldrich® e diluídos com metanol até a concentração de 100 µg/mL. Antes das análises por CLAE os padrões foram filtrados através de um filtro de membrana (PTFE) de 0,45 µm.

4.3.2 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

4.3.2.1 Preparo da Amostra

Foram utilizados dois métodos para extrair as substâncias da *A. colubrina*: Extração Líquido-Líquido e Extração em Fase Sólida. Inicialmente foram pesados 30 mg do extrato da *A. colubrina* e dissolvido em 30 mL de uma solução a 40% de álcool. O extrato dissolvido foi filtrado em membrana de 0,45 µm.

Em um funil de separação de 250 mL foi adicionado 30 mL do extrato dissolvido com pH 7,0, sendo 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 P.A ao funil de separação. O funil foi selado e agitado por 2 min, aliviando-se periodicamente a pressão. A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos para garantir a separação das fases aquosa e orgânica.

Após 30 minutos, foi feita a separação do extrato do acetato de etila. A fase orgânica foi transferida para um béquer e a fase aquosa foi descartada. A fase orgânica foi seca adicionando-se 20g de NaSO₄ anidro. O sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm e transferido para outro béquer. Em seguida, a fase orgânica extraída foi colocada em um dessecador até que o volume fosse reduzido para 3 mL.

4.3.2.2 Análise Cromatográfica

A identificação dos compostos orgânicos presentes no extrato bruto foi realizada 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), 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 1 min, 5°C/min até 100°C mantido por 5 minutos e 10°C/min até 200°C por um tempo de 20 minutos. 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 injetado foi de 1µL. O tempo de corte foi de 7,5 min e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 53 min. 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 foi realizada no modo full scan, e as temperaturas da fonte de íons e da linha de transferência do Espectrômetro de Massas foram, respectivamente, 200°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 7,3 min. Os espectros de massa foram comparados com os compostos de referência da biblioteca NIST.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

4.4.1 Microrganismos

Todos os testes foram realizados utilizando cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231, ATCC 90028 e MYA 2876) e quatro isolados clínicos recentes da cavidade oral. A coleta das cepas clínicas foi realizada em pacientes diagnosticados com candidose oral, em tratamento odontológico na Clínica de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa/UEPB. Número do parecer: 51779315.7.0000.5187). Todos os pacientes forneceram consentimento informado para participar do estudo.

4.4.2 Meios de Cultura

Foram utilizados o meio RPMI – 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) e o Ágar Sabouraud Dextrose (Merck®).

4.4.3 Preparo do Inóculo

Culturas de leveduras de 24 horas foram preparadas e adicionadas em solução 5mL de solução salina estéril (NaCl a 0,9%), padronizadas através de contagem de células em câmara de Neubauer (KASVI®), estabelecendo-se uma concentração de 5×10^3 UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução final resultou em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (CLSI, 2008).

4.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Microdiluição

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços (8 linhas A-H/ 12 colunas) foram depositados, em cada poço, 100 µL, do meio de cultura RPMI-1640. Em seguida, adicionou-se 100 µL do extrato da *A. colubrina* diluído em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) a 10%. Procedeu-se a microdiluição, onde 100 µL do conteúdo do primeiro poço foi homogeneizado e transferido para o seguinte, repetindo-se este procedimento até a última linha, obtendo-se concentrações do extrato entre 15,62 e 2.000 µg/mL. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 100 µL do inóculo de cada microrganismo, de crescimento recente, foi adicionado. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa de crescimento microbiano.

Foram incluídos nos testes a nistatina (Sigma-Aldrich®), como controle positivo, e o DMSO 10%, para confirmar a inocuidade do diluente. Assim como, o controle do crescimento do microrganismo e a esterilidade do meio de cultura e do extrato da *A. colubrina*.

4.4.5 Leitura dos Resultados da CIM

Após o período de incubação, foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2008).

4.4.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a concentração fungicida mínima, uma alíquota de 20 µL de cada poço, com concentrações maiores e iguais à CIM, foram subcultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37°C por 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu crescimento visível no meio utilizado.

4.5 ANÁLISE DA AÇÃO DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan NA PAREDE CELULAR DA *C. albicans*

4.5.1 Ensaio com Sorbitol

A ação da *A. Colubrina* na parede celular foi analisada pela técnica da microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando a metodologia anteriormente descrita (4.5), com acréscimo do Sorbitol (protetor osmótico sorbitol, 0,8M). O experimento foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

4.6 TESTE DE INIBIÇÃO DO BIOFILME

4.6.1 Substrato de Adesão de Biofilme

Foram preparados discos (10x10x5mm) em resina acrílica incolor quimicamente polimerizada (Vipi Flash, VIPI Produtos Odontológicos Ltda., Pirassununga, SP, Brasil), os quais serviram como substratos de adesão para biofilme. Os discos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (25°C, em proporções iguais de pó e líquido, sem incorporação de bolhas de ar) e, em seguida, imersos em água purificada a uma temperatura de 37°C por 24 horas para liberação de monômero residual. As superfícies dos discos foram submetidas a acabamento e polimento e, em seguida, desinfetados em água ultra purificada e álcool 70%, com o auxílio de equipamento de ultrassom, durante 20 minutos e, posteriormente, armazenados em tubo de vidro com água destilada (FREITAS-FERNANDES et al., 2014).

4.6.2 Preparo de Inóculo

Uma cultura de cada cepa de *C. albicans* foi reativada e incubada por 24 horas a 37°C. As células foram colhidas e suspensas em Sabouraud Dextrose Caldo (KASVI®) suplementado com 1% de glicose. O inóculo foi padronizado na concentração de 1×10^7 UFC/mL, através de contagem celular em câmara de Neubauer (KASVI®).

4.6.3 Formação da Película de Saliva nos Substratos

Uma amostra de 50 mL de saliva foi coletada, do próprio pesquisador, no dia de cada experimento, através da estimulação mastigatória com filme flexível (Parafilm M; American Can Co, Neenah, WI). Em seguida, a saliva foi clarificada em centrífuga, sob agitação de 5200 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado para uso imediato. Para a formação da película de saliva, os discos de resina foram colocados em uma placa Petri, a qual foi incubada com a saliva clarificada por 1 hora e 30 minutos, sob temperatura de 37°C.

4.6.4 Ensaio do Biofilme

Os discos de resina foram transferidos para placas de 24 poços contendo 2 mL da suspensão fúngica padronizada (1×10^7 UFC/mL). O biofilme foi desenvolvido por 24 horas. O teste foi realizado em triplicata e repetido em três experimentos independentes.

4.6.5 Protocolo de Tratamento

O extrato da *A. colubrina* foi testado nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL. Após o crescimento do biofilme por 24 horas, os discos de resina foram lavados em solução salina (NaCl a 0,9%) e imersos em placas de 24 poços estéreis, contendo os seguintes grupos: *A. colubrina* 500 µg/mL, *A. colubrina* 1000 µg/mL, controle positivo (nistatina, Sigma-Aldrich®) e controle negativo (meio de cultura sem tratamento). O período de tratamento foi de 24 horas. Após o tratamento, os discos foram removidos e lavados em NaCl a 0,9% e, posteriormente, inseridos em tubos contendo 2 mL de solução salina (NaCl a 0,9%).

4.6.6 Quantificação de Células Viáveis do Biofilme

Os discos foram coletados dos tubos contendo 2 mL de solução salina e removidos os biofilmes através de sonificação sob 7 W por 30 segundos. A solução sonificada passou então por diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi plaqueada, em triplicata, em meio Ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Em seguida, as unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL,

4.7 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

4.7.1 Preparo do Inóculo

Culturas de *Candida albicans* foram reativadas e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, as células fúngicas foram colhidas e suspensas em meio de cultura Sabouraud Dextrose

caldo (KASVI®). A padronização do inóculo foi realizada através do uso da câmara de Neubauer (KASVI®), obtendo-se uma concentração de 1×10^6 UFC/mL.

4.7.2 Preparo das Amostras

O extrato da *A. colubrina* foi diluído em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) a 10% nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. A nistatina (Sigma-Aldrich®), diluída em meio de cultura Sabouraud Dextrose caldo, foi utilizada como controle positivo. Foi preparado também um controle de crescimento do microrganismo, referindo-se ao inóculo sem tratamento. As amostras foram inseridas em placas de 24 poços estéreis, juntamente com o inóculo padronizado, e incubadas sob agitação durante 24 horas a 37°C , em estufa de crescimento microbiano.

4.7.3 Microscópio de Fluorescência

As células fúngicas tratadas conforme descrito no tópico anterior (4.7.2), foi retirado o volume de 1 mL de cada tratamento e colocado em microtubos individuais. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, o sobrenadante foi retirado e adicionados 150 μL de solução Calcofluor White (Sigma-Aldrich). Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, 10 μL da suspensão de células coradas foram inseridas em lâmina de vidro e visualizadas sob campo brilhante e UV/DAPI, em Microscópio óptico de fluorescência (Zeiss®) com auxílio do Software ZEN Lite 2012 (Zeiss®). Este experimento objetivou evidenciar a marcação de quitina na parede celular do microrganismo.

4.7.4 Microscópio Invertido

As placas de 24 poços, após o protocolo de tratamento (4.7.2), foram analisadas em microscópio invertido (Zeiss), para análise da indução de transição morfológica. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise da atividade antibiofilme utilizou-se a análise de variância a um critério fixo (ANOVA one way) com pós teste de Tukey e nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$), no programa Statistical Package for Social Sciences v. 20 (SPSS Statistics, v. 20, IMB, Chicago, IL). Os demais dados foram analisados de forma descritiva.

PLANO DE ANÁLISE II

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Foram testados o extrato hidroalcoólico e as frações ativas da *A. colubrina*. Realizou-se o fracionamento do extrato através de coluna cromatográfica filtrante em funil de placa porosa com fase sólida de celulose (Cellulose microcrystalline - Merck®), através de partição sólido-líquido, de acordo com o gradiente de polaridade: hexano (2 x 100 mL); diclorometano (1x100 mL); diclorometano:metanol (1x100 mL - 95:5; 1x100 mL - 90:10; 1x100 mL - 50:50); metanol (1x250 mL) e metanol:água (1x100 mL – 50:50). As 17 frações resultantes foram monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e reunidas conforme o perfil de similaridade e colorações diante do revelador empregado e, em seguida, concentradas à vácuo (BUCHI Rotavapor® R-215). Após este procedimento, foram selecionadas as frações que continham os grupos de interesse para a avaliação das atividades biológicas: fração metanólica, diclorometano:metanol (50:50) e fração hidrometanólica (50:50).

As linhagens utilizadas no estudo foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI), em Frederick, Maryland, EUA. As linhagens celulares utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa (Tabela 1), foram cultivadas em frascos com 5 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco® -BRL, Grand Island, NY, USA) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Forma Scientific®, CO₂ Water Jacketed Incubator), durante 24 horas.

Quadro 1. Linhagens celulares utilizadas nos testes antiproliferativos.

ORIGEM CELULAR	LINHAGEM	ORIGEM
Glioma	U251	Tumoral
Mama	MCF-7	Tumoral
Ovário resistente	NCI- ADR/RES	Tumoral
Rim	786-0	Tumoral
Pulmão	NCI-H460	Tumoral
Próstata	PC-3	Tumoral
Cólon	HT-29	Tumoral
Queratinócito	HaCat	Não- tumoral

Foram preparadas suspensões celulares, para cada linhagem, com meio RPMI-1640 acrescido de 5% de SFB e 1% de penicilina:estreptomicina, e ajustadas em suas respectivas densidades de inoculação. Em placas de 96 poços, foram inseridos 100 µL da suspensão celular,

sendo as placas posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Foi também preparada uma placa controle (placa T₀), com todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

A amostra foi diluída em DMSO na concentração de 0,1 g/mL. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Em seguida, foi adicionada nas concentrações de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL, (100 µL por poço – Placa T) em triplicata e incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL, (100 µL por poço) em triplicata.

No momento da adição das amostras, as células inoculadas na placa T₀ foram fixadas com a adição de 50 µL por poço de TCA a 50%, para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas. O TCA atua como fixador, precipitando proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram fixadas com TCA a 50% e incubadas por 1 hora. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, e foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 µL por poço do corante proteico Sulforrodamina B a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%. A SRB é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citocida da amostra em teste (SKEHAN et al., 1990). Em seguida as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético a 1%, para remover o corante não ligado às células e, após a secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL por poço de solução de Trizma Base (10µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax) a 540 nm. A porcentagem de inibição do crescimento de cada amostra testada foi calculada pela seguinte equação: $100 \times [(T-T_0) / (C-T_0)]$, quando $T_0 < T \leq C$, e $100 \times [(T-T_0) / (T_0)]$, quando $T \leq T_0$, onde T equivale a média das absorbâncias das células tratadas, C ao controle de células e T₀ ao controle das células no dia da adição das amostras.

4.10 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

4.10.1 Avaliação da Citotoxicidade sobre a Viabilidade Celular de Cultura de Células de Macrófagos RAW 264.7

Para análise da viabilidade celular de macrófagos foi desenvolvida a mesma metodologia do item anterior (4.9), utilizando uma suspensão de células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATTC, Manassa, VA, USA) e o extrato da *A. colubrina* nas seguintes concentrações: 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; 7,81 µg/mL; 3,91 µg/mL; 1,95 µg/mL; 0,98 µg/mL; 0,49 µg/mL e 0,24 µg/mL.

A viabilidade celular foi calculada através da equação: viabilidade celular (%) = $(A_{amostra}/A_{controle}) \times 100\%$, onde $A_{amostra}$ e $A_{controle}$ equivalem às absorbâncias das amostras com e sem a adição do tratamento, respectivamente.

4.10.2 Avaliação da Citotoxicidade sobre a Viabilidade Celular de Cultura de Células de Fibroblastos NIH3T3 e Pré-Osteoblastos MC3T3-E1

As células (fibroblastos – NIH3T3 – e pré-osteoblastos – MC3T3-E1) foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço. Foi realizada a avaliação da viabilidade celular e curvas de crescimento através do ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], o qual avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução de MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e NADH, resultando na formação de cristais de formazan. Estes cristais são solubilizados através da adição de DMSO e a sua concentração pode ser determinada através da densidade óptica a 570nm. A quantidade de formazan é proporcional ao número de células viáveis. O extrato da *A. colubrina* foi testado nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a atividade antiproliferativa, através da curva concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI_{50} (concentração necessária da amostra para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear, usando software Origin 8.0 (OriginLab Corporation) (MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006).

Os dados da viabilidade celular foram tabulados e analisados estatisticamente no programa Statistical Package for Social Sciences v. 20 (SPSS Statistics, v. 20, IMB, Chicago, IL). Inicialmente, os dados da citotoxicidade sobre macrófagos foram avaliados quanto a sua distribuição, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, utilizou-se a análise de variância a um critério fixo (ANOVA one-way) e análise post-hoc pelo teste de Tukey. Para os resultados da citotoxicidade sobre fibroblastos e pré-osteoblastos, a análise foi não-

paramétrica. Foi realizado o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os produtos testados foram considerados como fator de estudo e o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 PLANO DE ANÁLISE I

Artigo 1, a ser submetido para publicação no periódico Journal of Medical Microbiology, Qualis B1 (ANEXO A).

***Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan: perfil químico e atividades anticandida e antibiofilme**

Resumo

Objetivo: Este estudo investigou o perfil químico e as atividades anticandida e antibiofilme do extrato hidroalcoólico da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Metodologia:** A composição química foi investigada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Para as análises da suscetibilidade antimicrobiana foram utilizadas cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231, ATCC 90028 e MYA 2876) e quatro isolados clínicos recentes de candidose oral. Foram realizados ensaios de microdiluição em caldo para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), com e sem sorbitol, e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para análise da atividade antibiofilme, foram testadas duas concentrações do extrato (500 µg/mL e 1000 µg/mL) sobre biofilme de *C. albicans* de 24 horas, cujas análises incluíram quantificação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e avaliação morfológica em microscópio óptico invertido e de fluorescência. **Resultados:** O extrato da *A. colubrina* revelou presença de flavonoides, triterpenos, esteroides e ácidos fenólicos. Apresentou forte atividade antifúngica sobre as cepas padrão, com valores de CIM entre 7,81 e 15,62 µg/mL e moderada atividade para as cepas clínicas, CIM entre 250 e 500 µg/mL. Na presença do sorbitol a CIM foi igual ou maior que 2000 µg/mL. Apresentou, também, atividade antibiofilme, com evidente redução do número de UFC/mL e alterações morfológicas. **Conclusões:** O extrato da casca da *A. colubrina* tem predominância de compostos fenólicos, com expressivas atividades anticandida e antibiofilme, resultantes da provável interação com a parede celular da *C. albicans*.

PALAVRAS-CHAVE: Phytotherapy. Antimicrobial agents. Biofilms. *Candida albicans*.

1. Introdução

A *Candida albicans* é considerada uma das espécies de *Candida* mais patogênicas em humanos [1]. Reside em comensalismo nas mucosas oral, conjuntival, gastrointestinal e geniturinária, no entanto, causa infecções importantes, como a candidose, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos [2,3]. Em pacientes infectados pelo HIV, a candidose oral representa a infecção fúngica mais comum, e, geralmente, indica a progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) [4-6]. Decorre da alteração do ténue equilíbrio fungo-hospedeiro, em que as condições propiciam a expressão de fatores de patogenicidade pela *Candida*, como alterações fenotípicas, expressão de adesinas, transição levedura-hifa e secreção de enzimas, promovendo sua adesão às superfícies e, conseqüentemente, a infecção [7,8]. Estudos têm demonstrado o aumento da resistência de espécies de *Candida* aos antifúngicos comumente utilizados para o tratamento da candidose [9-12], atribuído ao desenvolvimento de mecanismos celulares e moleculares de defesa. Dentre esses mecanismos, destacam-se: a formação de biofilme, redução do acúmulo intracelular do fármaco, sistemas de efluxo multidrogas e redução da expressão dos alvos aos medicamentos [13-15].

Essas evidências de menor sensibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos e os relatos de toxicidade das formulações alopáticas disponíveis sustentam a necessidade de novas estratégias terapêuticas [1,16,17]. Nesse sentido, estudos sobre compostos biologicamente ativos, provenientes de plantas medicinais, desempenham um importante papel. Este valor terapêutico das plantas medicinais é resultante das interações dos seus fitocompostos com os diferentes alvos celulares, que resultam em variadas ações farmacodinâmicas [18].

A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, conhecida popularmente como “angico”, é uma das plantas que vem sendo investigada em relação a atividade anticandida [21-25]. Trata-se de uma planta medicinal, comumente utilizada pela população do nordeste brasileiro para o tratamento de infecções nos ovários, bronquite e inflamações em geral [19,20]. O potencial antifúngico do extrato da casca da *A. colubrina* é atribuído à presença de polifenóis, os quais são capazes de inativar enzimas essenciais para o crescimento dos fungos [21-25]. Em relação à caracterização deste extrato como fonte de compostos bioativos com ação antifúngica, algumas avaliações ainda são necessárias como, por exemplo, o detalhamento do seu perfil químico, avaliações de possíveis induções de transições morfológicas, interação do extrato com a célula fúngica e seu potencial em reduzir o biofilme de *C. albicans*, incluindo isolados clínicos frescos de candidose oral.

Este estudo tem como objetivo identificar o perfil químico e as atividades anticandida e antibiofilme do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* sobre cepas de referência de *Candida albicans* e isolados clínicos recentes de candidose oral.

2. Material e Métodos

2.1 Material Vegetal

A planta foi coletada na região do semiárido paraibano, Brasil (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W), no mês de setembro. O espécime testemunho da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba (n° 667/ACAM).

Foi obtido o extrato hidroalcoólico a 80% da casca da planta, através de maceração por 48 horas, utilizando-se a proporção de 10mg da planta para 25mL de álcool etílico a 80% [25]. Foram realizadas três filtrações e, em seguida, evaporação à vácuo e liofilização. O rendimento obtido foi de 31,7%.

2.2 Perfil Químico

2.2.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato da *A. colubrina* foi diluído com metanol até a concentração de 0,5 mg/mL. As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Shimadzu®), equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A, um forno para coluna CTO-20A e um detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp (DAD), acoplados a uma interface CBM-20A. A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna C18 de 150x4,6 mm. A taxa de fluxo utilizada foi de 1 mL/min e o volume de injeção da amostra de 20 µL. O método analítico empregou um sistema de gradiente de eluição utilizando como fase móvel (B) metanol/ (A) ácido acético (0,5 %) em água milli-q. O sistema de eluição iniciou com 5% de B durante 2 minutos, 5 – 10% de B durante 2 – 5 minutos, 10 – 30% de B durante 5 – 10 minutos, 30 – 33% de B durante 10 – 20 minutos, 33 – 35% de B durante 20 – 25 minutos, 35 – 100% de B durante 25 – 35 minutos, finalizando a análise. Os cromatogramas obtidos foram analisados com comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos compostos foi realizada através da co-injeção de substâncias padrões (Sigma-Aldrich®), baseando-se no seu espectro de absorção (UV) e no tempo de retenção.

2.2.2 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Foram utilizados dois métodos para extrair as substâncias da *A. colubrina*: Extração Líquido-Líquido e Extração em Fase Sólida. Inicialmente o extrato foi diluído em álcool a 40% e, posteriormente, filtrado. Em um funil de separação iniciou-se a extração dos compostos orgânicos presentes no extrato, adicionando-se acetato de etila P.A (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, a fase orgânica foi separada e seca adicionando-se NaSO₄ anidro (Sigma-Aldrich®) e inserindo-a em dessecador para redução do volume. A identificação dos compostos orgânicos presentes no extrato bruto foi realizada em 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), 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 1 min, 5°C/min até 100°C mantido por 5 min e 10°C/min até 200°C por um tempo de 20 min. 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 injetado foi de 1 µL. O tempo de corte foi de 7,5 min e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 53 min. 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 foi realizada no modo full scan, com a temperatura da fonte de íons e da linha de transferência do Espectrômetro de Massas, respectivamente, em 200°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 7,3 min. Os espectros de massa foram comparados com os compostos de referência da biblioteca NIST.

2.3 Microrganismos

Todos os testes foram realizados utilizando cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231, ATCC 90028 e MYA 2876) e quatro isolados clínicos recentes da cavidade oral. A coleta das cepas clínicas foi realizada em pacientes diagnosticados com candidose oral, em tratamento odontológico na Clínica de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa/UEPB. Número do parecer: 51779315.7.0000.5187). Todos os pacientes forneceram consentimento informado para participar do estudo.

2.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A atividade anticandida do extrato da *A. colubrina* foi identificada pela determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM), de acordo com as

normas *Clinical and Laboratory Standards Institute* [26]. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, contendo 100µL/poço do meio de cultura específico (RPMI 1640 - Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA). O extrato foi diluído em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) a 10% e transferido um volume de 100µL para o primeiro poço. Realizaram-se as diluições seriadas, obtendo-se concentrações entre 15,62 e 2000 µg/mL. A suspensão fúngica ($5,0 \times 10^3$ UFC/mL) foi adicionada aos poços e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Também foram incluídos no experimento: a nistatina (Sigma-Aldrich®), como controle positivo; o DMSO 10%, para confirmar a inocuidade do diluente; e o controle negativo (sem tratamento). A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano visível, cuja leitura baseou-se na mudança ou não da coloração do meio RPMI 1640. Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM), alíquotas de 20 µL de cada poço, com concentrações maiores e iguais a CIM, foram semeadas em meio Agar Sabouraud Dextrose (Merck®) e incubadas a 37°C por 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento visível no meio sólido utilizado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

2.5 Ação na Parede Celular da *C. albicans*

A ação da *A. colubrina* na parede celular foi analisada pela técnica da microdiluição em caldo, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) na presença de sorbitol (protetor osmótico sorbitol, 0,8M), utilizando a metodologia já descrita no item anterior para o teste de susceptibilidade. O experimento foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes.

2.6 Teste de Inibição do Biofilme

Para avaliação da atividade antibiofilme do extrato da *A. colubrina* foram utilizados discos de resina acrílica termopolimerizável. Os discos foram colocados em placas Petri contendo saliva humana centrifugada, doada pelo próprio pesquisador, para a formação da película adquirida. Essas placas foram incubadas em estufa por 1 hora e 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, os discos foram transferidos para placas de 24 poços, contendo 2 mL da suspensão fúngica (1×10^7 UFC/mL), preparada em meio de cultura sabouraud dextrose caldo (Kasvi®), suplementado com 1% de glicose. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para formação do biofilme. Após este período, os discos de resina foram lavados em solução salina (NaCl a 0,9%) e imersos em placas estéreis de 24 poços, contendo os seguintes grupos: *A. colubrina* 500µg/mL, *A. colubrina* 1000 µg/mL, controle positivo (nistatina, Sigma-Aldrich®) e controle negativo (meio de cultura sem tratamento). Após o tratamento de 24 horas,

os discos foram removidos e lavados com solução salina e posteriormente inseridos em tubos contendo 2 mL de NaCl 0,9%, para remoção do biofilme através de sonificação por 30 segundos. A suspensão microbiana obtida foi utilizada para quantificar o número de células viáveis, representadas pelas unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), em meio ágar Sabouraud dextrose (Merck®), após 48 horas de incubação. O teste foi realizado em triplicata e repetido em três experimentos independentes.

2.7 Análises Morfológicas

Em placas estéreis de 24 poços foi distribuída a suspensão fúngica (1×10^6 UFC/mL) de crescimento recente (24 horas), preparada em meio de cultura Sabouraud dextrose caldo (Kasvi®), juntamente com as amostras do extrato nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas sob agitação, por 24 horas a 37°C. Após esse período, as amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando como fluoróforo o Calcofluor White (Sigma-Aldrich®), e em microscópio invertido.

Para análise em microscopia de fluorescência, foi removida uma alíquota de 1 mL de cada tratamento e distribuída em microtubos. Procedeu-se a centrifugação, remoção do sobrenadante e adição de 150 μL do fluoróforo. Uma alíquota de 10 μL de cada microtubo foi distribuída em lâminas de vidros e analisada sob campo brilhante e UV/DAPI, em Microscópio óptico de fluorescência (Zeiss®) com auxílio do Software ZEN Lite 2012 (Zeiss®), para evidenciar a marcação de quitina na parede celular da *C. albicans*. Para análise da transição morfológica, as placas de 24 poços, de acordo com cada tratamento, foram analisadas em microscópio óptico invertido (Zeiss®).

2.8 Análise Estatística

Para análise da atividade antibiofilme utilizou-se a análise de variância a um critério fixo (ANOVA one way) com pós teste de Tukey e nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$), no programa Statistical Package for Social Sciences v. 20 (SPSS Statistics, v. 20, IMB, Chicago, IL). Os demais dados foram analisados de forma descritiva.

3. Resultados

3.1 Perfil Químico

A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico do extrato da *A. colubrina* no comprimento de onda de 280 nm. Três compostos foram identificados: ácido gálico, (+)-catequina e ácido caféico, nos tempos de retenção de 9, 11 e 14 minutos, respectivamente.

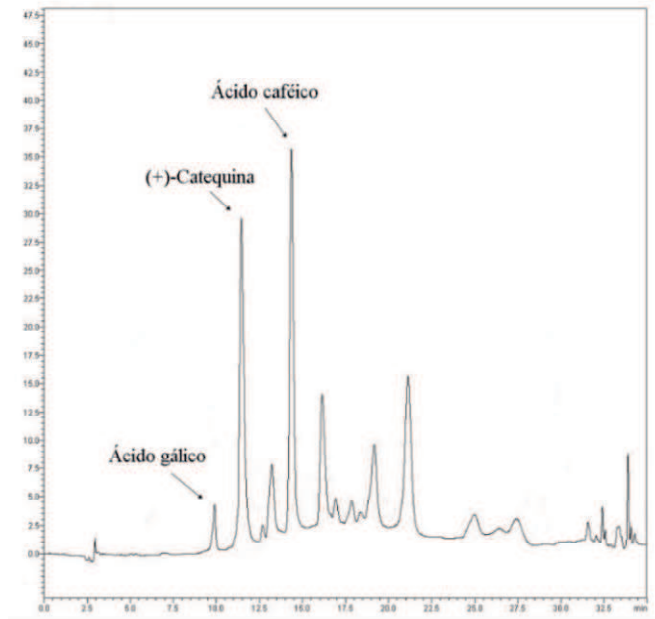


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (280 nm) identificados por CLAE.

A Tabela 1 mostra os compostos identificados utilizando CG-EM. Em cada composto identificado, foi especificado o tempo de retenção (TR), a fórmula molecular, a massa e a área do cromatógrafo obtido.

Tabela 1. Constituintes químicos identificados no extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan através da análise por CG-EM.

Compostos	TR	Formula molecular	Massa	Área
Ciclohexanol 1 TMS	6.234	C ₉ H ₂₀ OSi	172	18011
Ácido láctico 2TMS	8.048	C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂	234	40683
L-alanina 2TMS	9.556	C ₉ H ₂₃ NO ₂ Si ₂	233	47106
L-prolina 1TMS	12.096	C ₈ H ₁₇ NO ₂ Si	187	474366
Ácido Etil Fosfórico 2TMS	14.294	C ₈ H ₂₃ O ₄ PSi ₂	270	22825
Ácido piperídico 1TMS	15.437	C ₉ H ₁₉ NO ₂ Si	201	39137
Ácido fosfórico 3TMS	16.123	C ₉ H ₂₇ O ₄ PSi ₃	314	117923
Glicerol 3TMS	16.178	C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃	308	14157
L-prolina 2TMS	16.756	C ₁₁ H ₂₅ NO ₂ Si ₂	259	1644361
Ácido piperídico 2TMS	19.103	C ₁₂ H ₂₇ NO ₂ Si ₂	273	33090
Ácido málico 3TMS	23.578	C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃	350	65496
Eritritol 4TMS	24.397	C ₁₆ H ₄₂ O ₄ Si ₄	410	339959
Ribitol 5TMS	30.862	C ₂₀ H ₅₂ O ₅ Si ₅	512	57106
Ribitol 5TMS	30.989	C ₂₀ H ₅₂ O ₅ Si ₅	512	105284
Uridina 3 TMS	32.427	C ₁₈ H ₃₆ N ₂ O ₆ Si ₃	460	750762
Ácido 2-ceto-D-gluconico 5TMS	33.201	C ₂₁ H ₅₀ O ₇ Si ₅	554	538039
Ácido 2-ceto-D-gluconico 5TMS	33.419	C ₂₁ H ₅₀ O ₇ Si ₅	554	35056
β-D-Galactofuranose 5TMS	34.298	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	540	18764
Ácido sebáico 2TMS	34.948	C ₁₆ H ₃₄ O ₄ Si	346	31234
Glicopiranosose 5TMS	35.510	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	540	1119337
Sorbitol 6TMS	36.520	C ₂₄ H ₆₂ O ₆ Si ₆	614	127960
Glicopiranosose 5TMS	36.709	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	540	141309
Ácido gálico 4TMS	36.901	C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄	458	27547
Inositol 6TMS	37.084	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	612	200045
Glicopiranosose 5TMS	37.867	C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅	540	1252990
Inositol 6TMS	38.189	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	612	7460
Ácido palmítico 1TMS	38.612	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	328	68208
Inositol 6 TMS	40.402	C ₂₄ H ₆₀ O ₆ Si ₆	612	152813
Ácido eláidico 1TMS	42.609	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si	354	13568
Hidroquinona β-D-glicopiranosídeo 5TMS	49.797	C ₂₇ H ₅₆ O ₇ Si ₅	632	131112
D-Turanose 7TMS	51.309	C ₃₃ H ₇₈ O ₁₁ Si ₇	846	194561
Sucrose 8TMS	52.359	C ₃₆ H ₈₆ O ₁₁ Si ₈	918	38074360
Catequina 5TMS	55.962	C ₃₀ H ₅₄ O ₆ Si ₅	650	1135379
Catequina 5TMS	56.386	C ₃₀ H ₅₄ O ₆ Si ₅	650	437928
Acetato de lupeol	69.064	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	468	112267
Acetato de lupeol	69.957	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	468	307745

3.2 Atividade Anticandida e Ação na Parede Celular

Os valores da CIM, na ausência e na presença do sorbitol, e CFM para o extrato da *A. colubrina* encontram-se expressos na Tabela 2. Foi verificada forte atividade fungistática (CIM < 100µg/mL) frente a todas as cepas de referência e moderada atividade para os isolados clínicos (100µg/mL < CIM < 500µg/mL), de acordo com classificação estabelecida anteriormente [27]. Observou-se um aumento da CIM (CIM ≥ 2000 µg/mL) na presença de sorbitol para todas as cepas de *C. albicans*, indicando ação do extrato na parede celular fúngica. Em relação à atividade fungicida, não foi verificada atividade para nenhuma cepa testada (CFM ≥ 2000µg/mL).

Tabela 2. Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM), na ausência e na presença do sorbitol, e Fungicida Mínima (CFM) do extrato da *A. colubrina*, de acordo com a cepa de *Candida albicans*.

Microrganismos	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan		
	CIM – Sem sorbitol (µg/mL)	CIM – Com sorbitol (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	7,81	> 2000	2000
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	15,62	> 2000	2000
<i>Candida albicans</i> MYA 2876	15,62	> 2000	2000
<i>Candida albicans</i> Cepa clínica 01	250	> 2000	> 2000
<i>Candida albicans</i> Cepa clínica 02	500	2000	> 2000
<i>Candida albicans</i> Cepa clínica 03	250	2000	> 2000
<i>Candida albicans</i> Cepa clínica 04	250	2000	> 2000

3.3 Atividade Antibiofilme

Os resultados da atividade antibiofilme estão expressos na Figura 2. Observa-se redução no acúmulo de biofilme para todas as cepas testadas, em comparação ao controle negativo. Constatou-se diminuição do número de UFC/mL nos grupos tratados com o extrato da *A. colubrina*, com diferença estatisticamente significativa para três cepas testadas: *C. albicans* MYA 2876, *C. albicans* cepa clínica 02 e *C. albicans* cepa clínica 04.

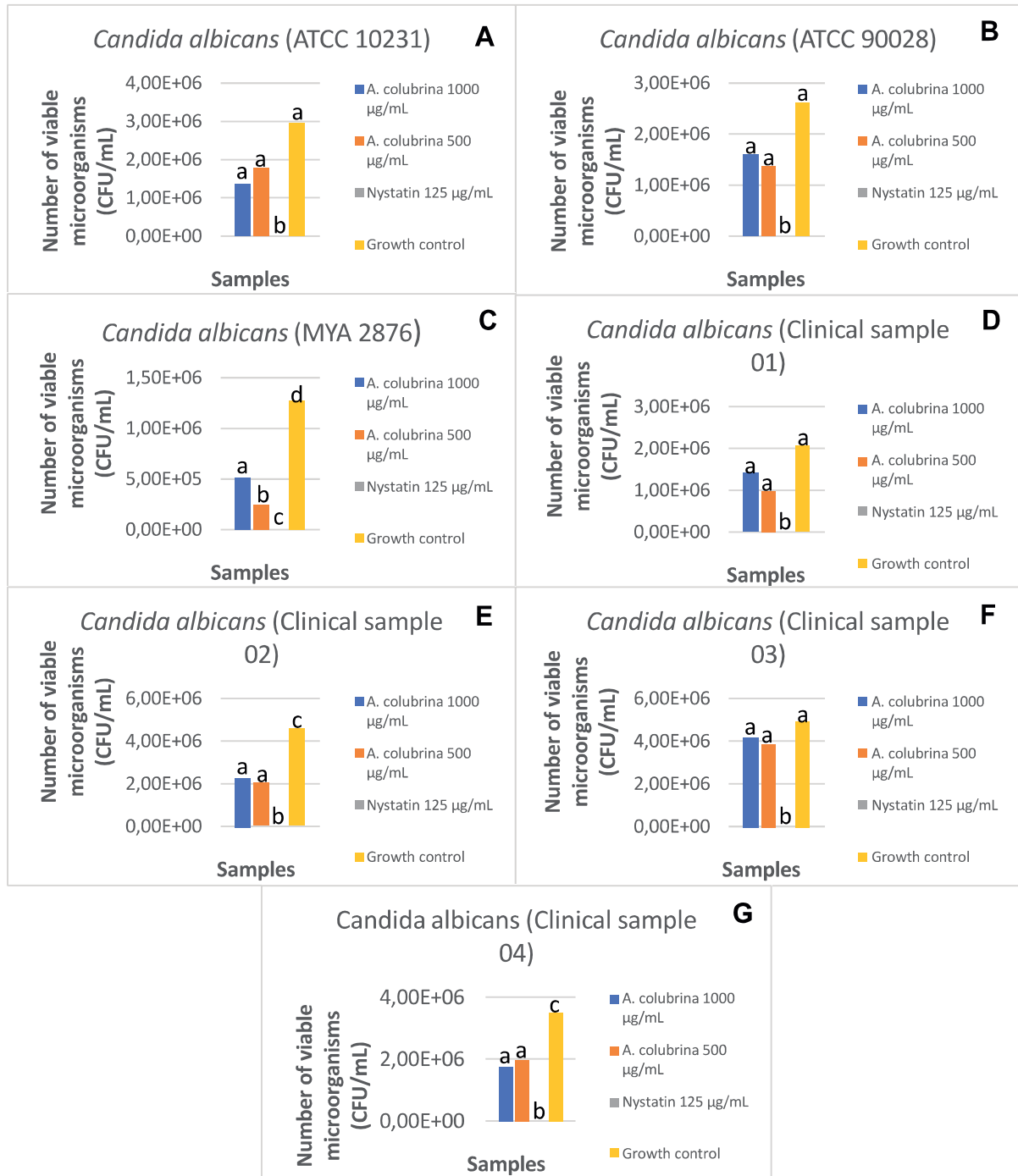


Figura 2. Viabilidade celular de diferentes espécies de *Candida albicans* organizadas em biofilme, após exposição às concentrações de 500 e 1000 µg/mL do extrato da *A. colubrina*. Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística.

3.4 Análises Morfológicas

A análise da morfologia da *C. albicans* pela microscopia de fluorescência revelou redução do aglomerado de células nos grupos tratados com o extrato de *A. colubrina*, especialmente, na concentração de 1000µg/mL, em relação ao controle negativo. De modo

geral, não foi verificado um padrão nos achados morfológicos, como também diferenças na expressão de quitina corada pelo Calcofluor White. No biofilme tratado com o extrato, observa-se uma coloração deste fluoróforo sombreando a célula, interferindo na definição dos contornos celulares. Algumas cepas apresentaram transição morfológica, com expressiva formação de hifas em relação ao controle negativo (Figura 3 e Figura 6) e menor definição dos contornos celulares (Figuras 4 e 5).

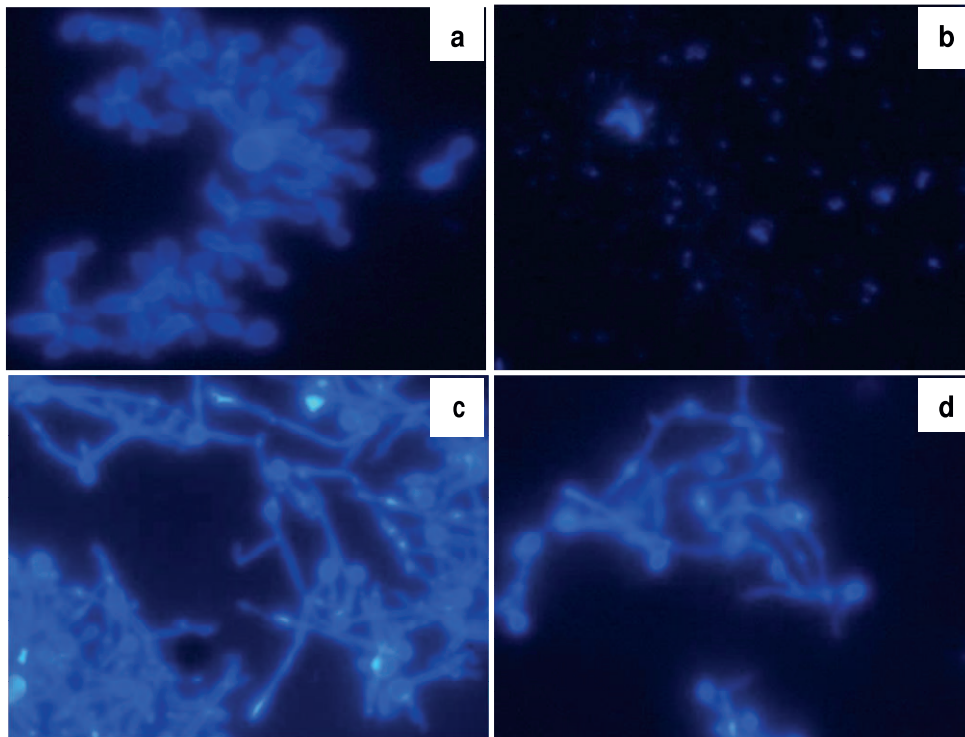


Figura 3. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* ATCC 10231 com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 3(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL- Figura 3(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 3(c), e 1000µg/mL - Figura (d).

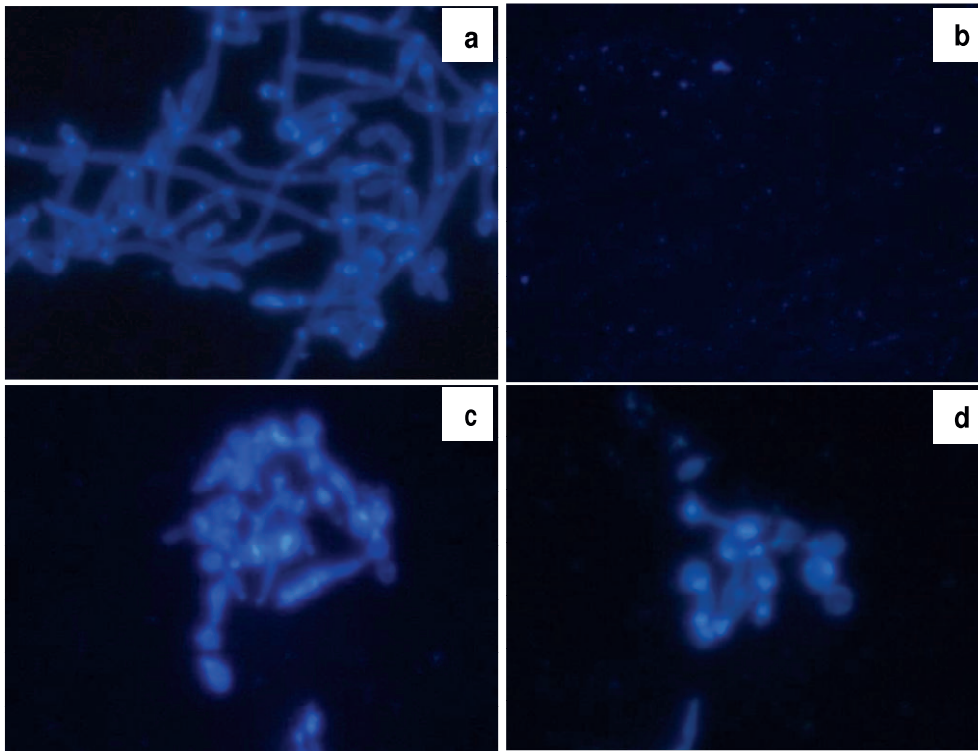


Figura 4. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* ATCC 90028 com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 4(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL- Figura 4(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 4(c), e 1000µg/mL - Figura 4(d).

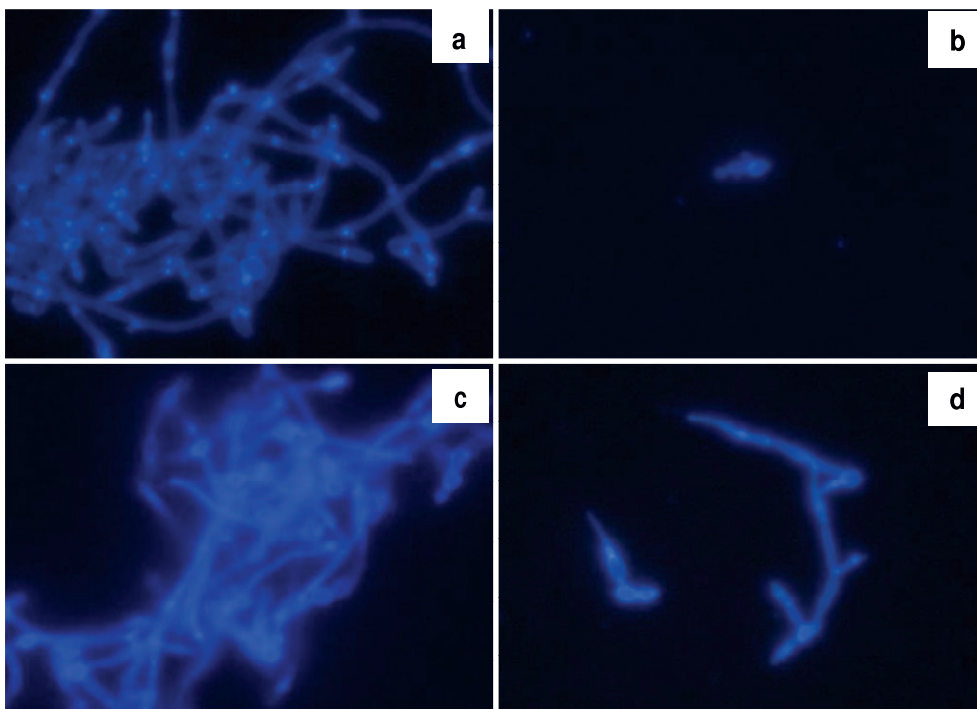


Figura 5. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* MYA 2876 com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 5(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 5(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 5(c), e 1000µg/mL - Figura 5(d).

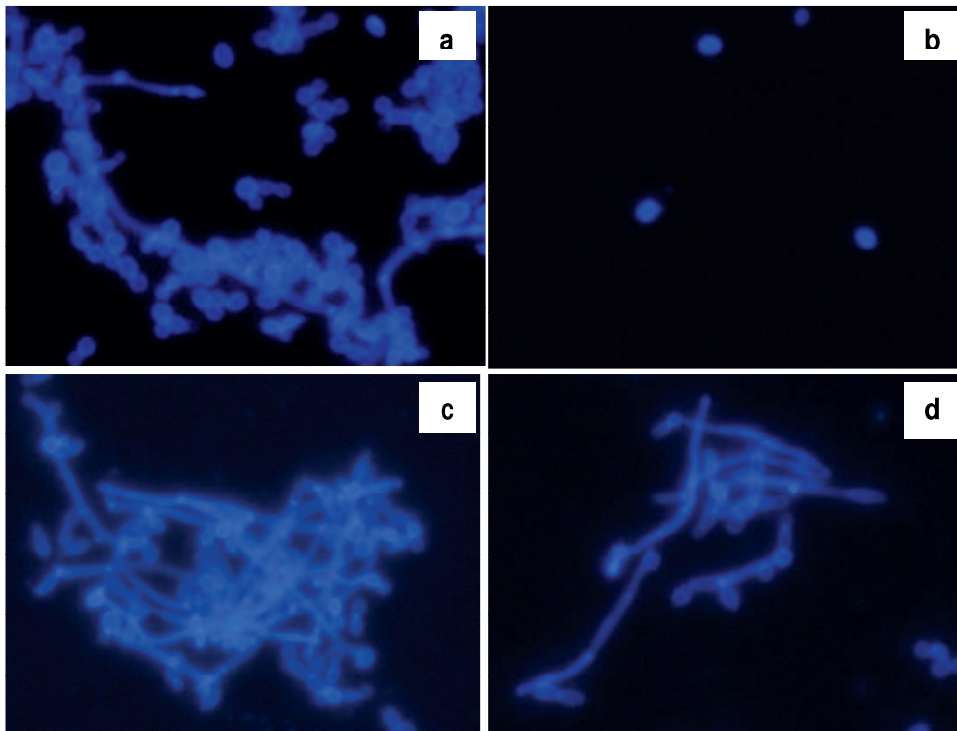


Figura 6. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 01) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 6(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 6(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 6(c), e 1000µg/mL - Figura 6(d).

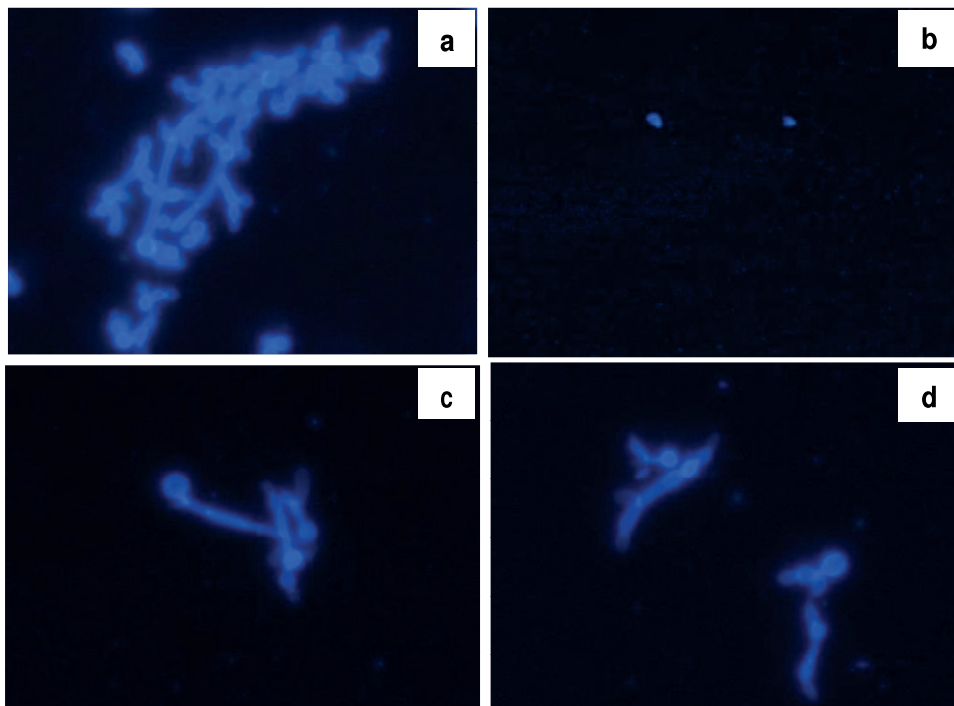


Figura 7. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 02) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 7(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 7(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 7(c), e 1000µg/mL - Figura 7(d).

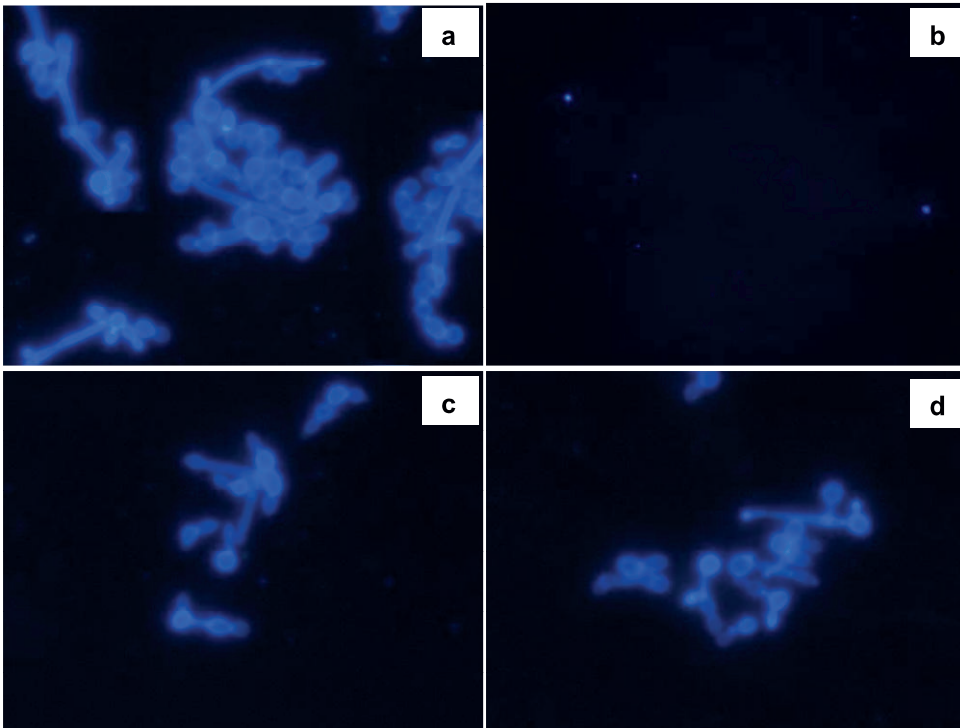


Figura 8. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 03) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 8(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 8(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 8(c), e 1000µg/mL - Figura 8(d).

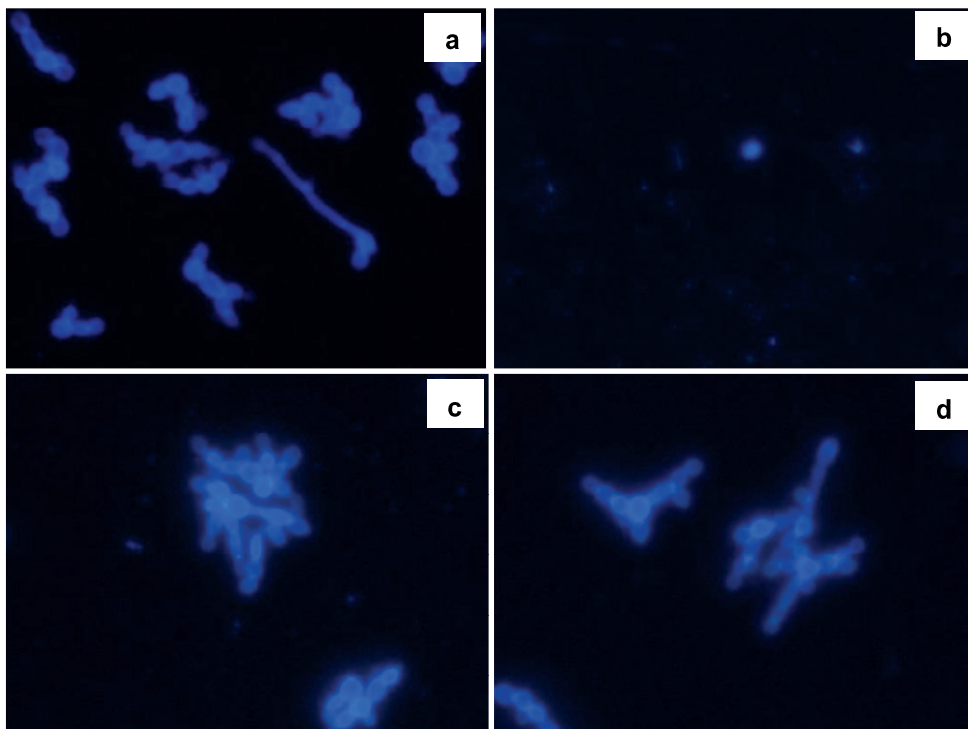


Figura 9. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* (cepa clínica 04) com aumento de 100x. Controle negativo - Figura 9(a). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 125µg/mL - Figura 9(b). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nas concentrações de 500µg/mL - Figura 9(c), e 1000µg/mL - Figura 9(d).

Na análise em microscópio óptico invertido observou-se redução do aglomerado de células nos grupos tratados com o extrato da *A. colubrina*, nas diferentes concentrações, além de aparente redução no volume celular, parede celular mais enegrecida e menor definição dos contornos celulares, indicando perda de integridade celular (Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

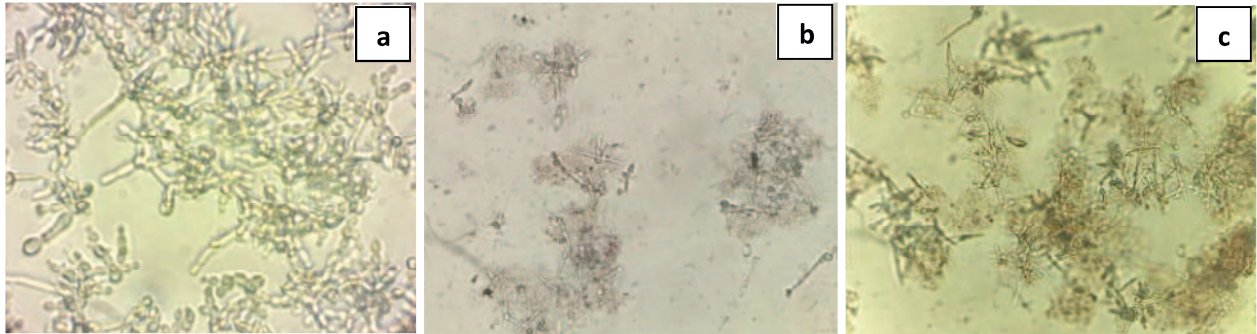


Figura 10. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* ATCC 10231 com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 10(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 10(b) e 1000µg/mL - Figura 10(c).

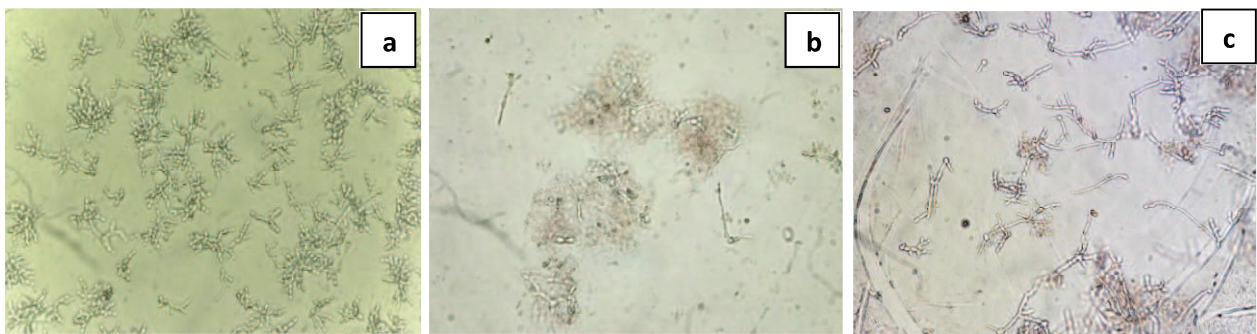


Figura 11. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* ATCC 90028 com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 11(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrinana* concentração de 500µg/mL - Figura 11(b) e 1000µg/mL - Figura 11(c).

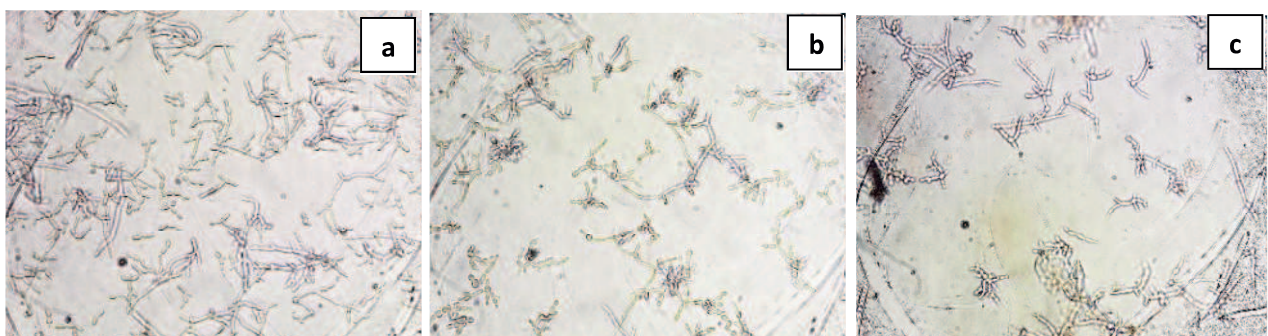


Figura 12. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* MYA 2876 com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 12(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 12(b) e 1000µg/mL - Figura 12(c).

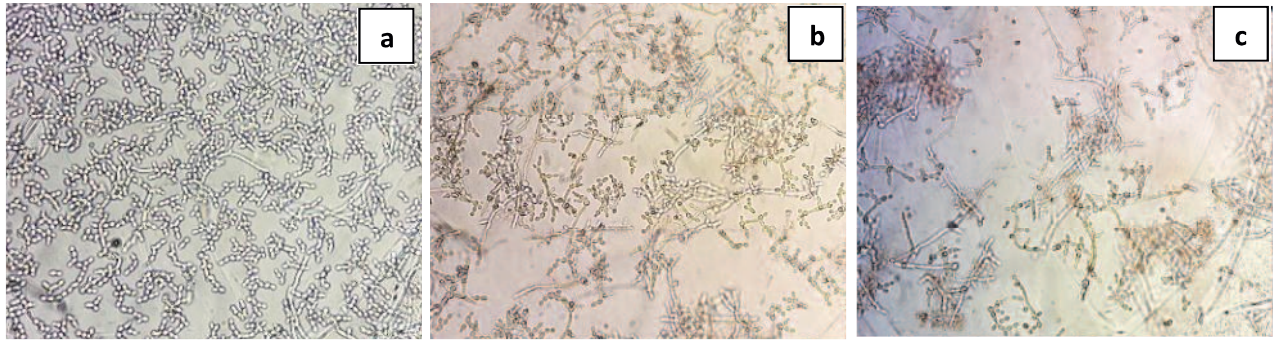


Figura 13. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 01) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 13(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 13(b) e 1000µg/mL - Figura 13(c).

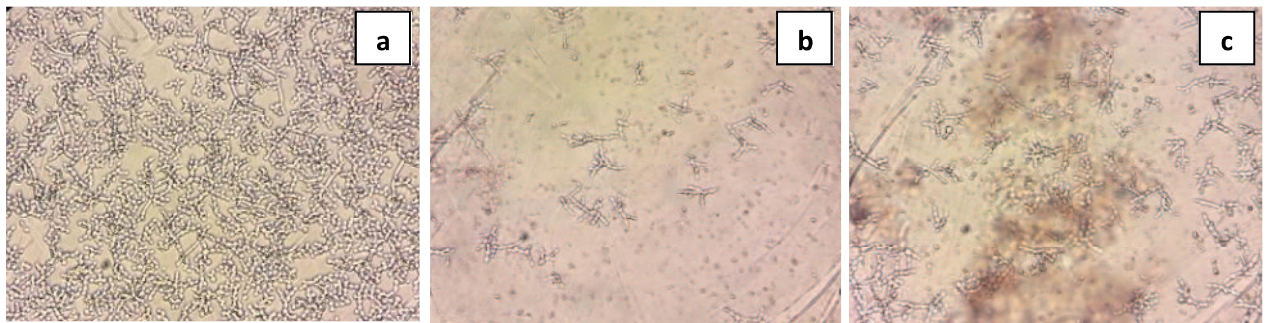


Figura 14. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 02) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 14(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 14(b) e 1000µg/mL - Figura 14(c).

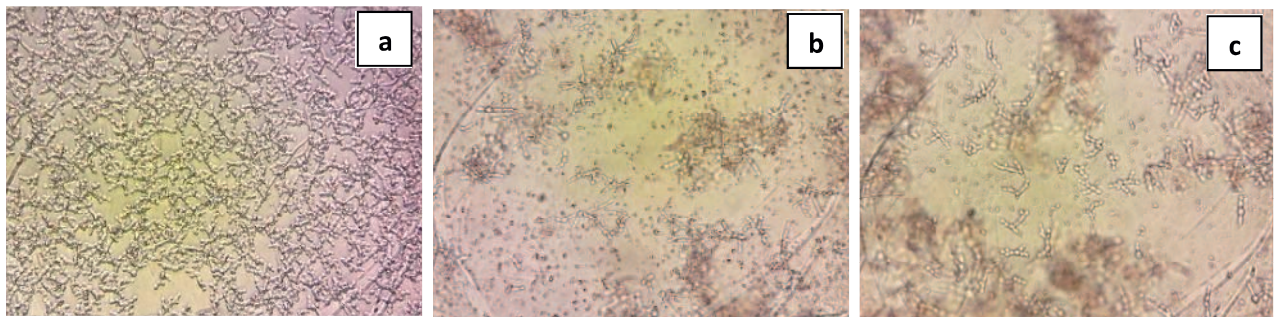


Figura 15. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 03) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 15(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 15(b) e 1000µg/mL - Figura 15(c).

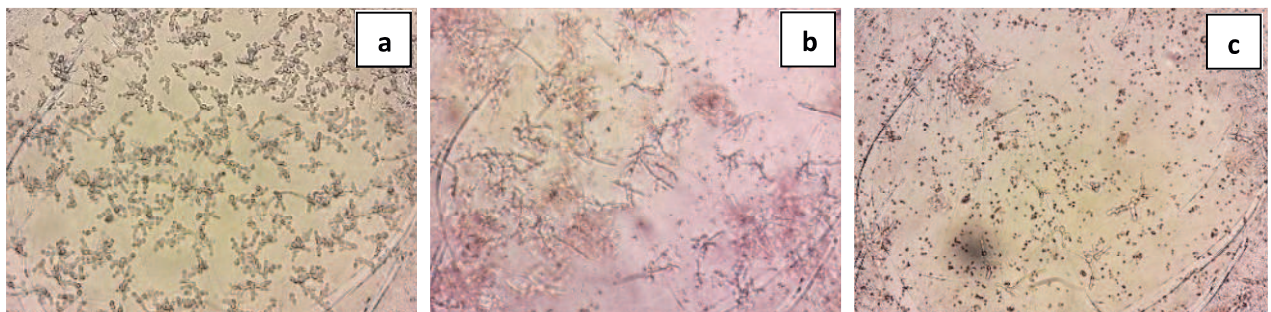


Figura 16. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* (cepa clínica 04) com aumento de 40x. Controle negativo - Figura 16(a). *C. albicans* tratada com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 500µg/mL - Figura 16(b) e 1000µg/mL - Figura 16(c).

4. Discussão

O perfil químico do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* foi caracterizado pela presença de flavonoides, triterpenos, esteroides e ácido fenólicos. Estudos anteriores também revelaram a presença desses compostos em extratos da *A. colubrina*, representados, especialmente, por polifenóis totais, como os flavonoides [19,20,24,28-31]. A presença desses suplementos bioativos pode justificar a ampla utilização da *A. colubrina* para fins medicinais [25,28]. Os compostos fenólicos são objeto de crescente interesse científico, em função dos seus benefícios à saúde humana, como no tratamento e prevenção de câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias [32].

Estudos anteriores também identificaram, através de análises por CLAE, a presença de ácido gálico em extrato da casca do caule da *A. colubrina*, além de quercetina, composto relacionado à catequina [29,30]. O ácido gálico é um ácido fenólico amplamente distribuído em diferentes famílias de plantas superiores, conhecido por sua promissora atividade anticandida [33,34]. Este composto demonstra a capacidade de reduzir a atividade do esteroide 14 α -demetilase (CYP51), uma enzima do citocromo P450 envolvida na biossíntese de esteróis [35,36]. A catequina possui a capacidade de esterificação a partir do ácido gálico, sendo, portanto, um dos principais ácidos fenólicos presentes em extratos [37]. Este composto pertence ao grupo de flavonóis e são capazes de suprimir a proliferação de *Candida* pela diminuição da produção de ATP [38-40]. A análise por CG-EM apresentou ampla variação na composição do extrato da casca da *A. colubrina*, com identificação de aminoácidos, ácidos graxos e abundância de carboidratos monossacarídeos e dissacarídeos, como a glicose e sucrose, conforme relato anterior [28]. Tal perfil químico pode justificar as expressivas atividades anticandida e antibiofilme identificadas neste estudo.

A atividade antibiofilme do extrato da *A. colubrina* tem importância clínica, uma vez que ainda existem limitações dos agentes antifúngicos comercialmente disponíveis para o tratamento da candidose [1,16,17,41]. O limitado arsenal, o aumento da resistência fúngica e os efeitos adversos dos antifúngicos alertam a necessidade de novas terapias, especialmente, a partir de produtos naturais [42].

A redução do biofilme de *C. albicans* após o tratamento com a *A. colubrina* pode ter sido resultado de um conjunto de interações, relacionadas à transição morfológica, expressão de adesinas, aquisição de nutrientes, resistência ao estresse oxidativo, alteração metabólica e produção de matriz extracelular [12]. A *C. albicans* é capaz de codificar diferentes fatores que definem seu fenótipo de patogenicidade, a exemplo de proteínas [43]. A produção de

proteínases é codificada por uma família de 10 genes, conhecidos como SAP, que se distribuem de maneira diferente entre as espécies e sua expressão pode ser influenciada por condições ambientais, que geralmente resultam em maior potencial invasivo fúngico [44]. Para analisar a interferência do extrato da *A. colubrina* nesses mecanismos, são necessários estudos de modulação do crescimento da *Candida*, assim como análises da interação com a célula do hospedeiro.

O fato dos isolados clínicos de *C. albicans* apresentarem valor da CIM maior do que as cepas padrão pode ser justificada pela maior expressão dos mecanismos de defesa pelos isolados clínicos, representados pelos fatores de patogenicidade, como toxinas, enzimas hidrolíticas e proteínas de aderência, além de possuir maior capacidade de variabilidade fenotípica [45]. Dentre esses fatores, destacam-se as enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como fosfolipases e aspartato proteases secretadas (SAPs), por desempenharem importante papel na infecção por *Candida*, uma vez que facilitam a aderência e penetração tissular e, conseqüentemente, a invasão no hospedeiro [45,46]. Considerando que 100% das cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral humana apresentaram atividade proteolítica [47,48], planeja-se para a próxima etapa deste estudo a análise da expressão proteolítica da *Candida albicans* quando tratada com o extrato da *A. colubrina*.

O extrato da *A. colubrina* apresentou efeito fungistático sobre a *C. albicans*, o qual foi capaz de inibir o crescimento fúngico, sem resultar na morte da célula. Considerando que a *C. albicans* faz parte da microbiota oral normal, a sua inibição ao invés da eliminação, pode representar uma estratégia positiva no controle da infecção, uma vez que pode evitar a emergência de outras espécies mais patogênicas, resultando em infecções possivelmente mais graves e mais resistentes aos tratamentos disponíveis [7].

O sorbitol funciona como estabilizador osmótico dos protoplastos fúngicos, evitando a lise das células [49]. Nos testes de susceptibilidade antimicrobiana realizados na presença do sorbitol observou-se elevação, oito vezes ou mais, nos valores da CIM para todas as cepas testadas, indicando ação do extrato da *A. colubrina* sobre a parede celular. A parede celular possui papel fundamental e é essencial a quase todos os aspectos da biologia e patogenicidade celular das leveduras, uma vez que está intimamente relacionada ao crescimento apical das hifas [50].

Nas análises por microscopia foi possível verificar alterações morfológicas, que também indicam ação do extrato sobre a parede celular. Na microscopia de fluorescência, por exemplo, foi observada menor precisão dos contornos celulares das cepas de *C. albicans* tratadas com o

extrato da *A. colubrina*. Este achado sugere alterações estruturais na célula, uma vez que, o Calcofluor White contém os polissacarídeos β 1-3 e β 1-4, que se ligam à quitina presente na parede celular da *C. albicans* [51]. Algumas cepas revelaram valores de CIM bastante baixos para o extrato da *A. colubrina*, no entanto, apresentaram expressiva transição morfológica de levedura para hifa. Este achado pode constituir um mecanismo de autodefesa [52], no entanto, é preciso analisar, em estudo de modulação e interação com a célula do hospedeiro, se esta modificação morfológica potencializa ou não o processo de infecção.

O extrato da *A. colubrina* demonstrou evidente potencial fungistático, com atividade antibiofilme de *C. albicans*. No entanto, tornam-se necessários estudos de modulação dos fatores de patogenicidade da *Candida* e sua interação com a célula do hospedeiro, mediante o tratamento com o extrato da *A. colubrina*. Além disso, recomenda-se a realização de estudos que identifiquem e isolem os compostos químicos bioativos, com vistas à síntese de novos fármacos para o tratamento da candidose oral.

5. Conclusão

O extrato da *A. colubrina* apresenta predominância de compostos fenólicos e expressivas atividades inibitórias sobre o crescimento de *C. albicans*, com redução do seu biofilme *in vitro*, em função da sua provável ação sobre a parede celular fúngica.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Chamada Pública MCTI/CNPq/MEC/Capes – Ação Transversal nº06/2011 – Casadinho/Procad (Convênio Federal Casadinho/Procad, Nº 552561/2011-8 do CNPq/MCT e Capes/MEC). Projeto: “Caracterização e potencial bioativo de extratos de plantas da região do semiárido, com perspectivas de desenvolvimento de formulações farmacêuticas”.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não possuem conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

1. **Spampinato C, Leonardi D.** Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International* 2013; 2013.
2. **Ferreira GL, Pérez AL, Rocha ÍM, Pinheiro MA, Castro RD et al.** Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015.
3. **Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B.** Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection* 2011;13;12-13:963–976.

4. **Terai H, Ueno T, Suwa Y, Omori M, Yamamoto K et al.** Candida is a protracting factor of chronic oral ulcers among usual outpatients. *Japanese Dental Science Review* 2018;54:52-58.
5. **Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa AC et al.** Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012;54:17-24.
6. **Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E et al.** Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* 2010;25:385-389.
7. **Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C et al.** The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife* 2015.
8. **Alby K, Bennett RJ.** Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* 2009;20:3178-3191.
9. **Lukaszuk C, Krajewska-Kulak E, Kulak W.** Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015. *PeerJ* 2017;5:3038.
10. **Bandara HMHN, Matsubara VH, Samaranayake LP.** Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2017;15; 3:299-318.
11. **Schelenz S, Abdallah S, Gray G, Stubbings H, Gow I et al.** Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J Oral Pathol Med* 2011;40:83-89.
12. **Finkel JS, Mitchell AP.** Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 2011;9;2:109-118.
13. **Sanitá PV, Mima EGO, Pararina AC, Jorge JH, Machado AL et al.** Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;116:562-569.
14. **Bondaryk M, Kurzątkowski W, Staniszewska M.** Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postep Derm Alergol* 2013;5:293-301.
15. **Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT.** Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology* 2012;2012.
16. **Vila T, Romo JA, Pierce CG, McHardy SF, Saville SP et al.** Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence* 2017:1-9.
17. **Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJ.** *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013;62:10-24.
18. **Alexa E, Danciu C, Radulov I, Obistioiu D, Sumalan RM et al.** Phytochemical Screening and Biological Activity of *Mentha x piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. Extracts. *Analytical Cellular Pathology* 2018;2018.

19. **Araújo DRC, Silva LCN, Silva AG, Araújo JM, Macêdo AJ et al.** Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul. *African Journal of Microbiology Research* 2014;8;28.
20. **Araújo TAS, Castro VTNA, Solon LGS, Da Silva GA, Almeida MG et al.** Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? *Industrial Crops and Products* 2015;76.
21. **Silva, D.R.** Potencial Antifúngico e Antibiofilme Contra Espécies de *Candida* e Toxicidade da *Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, p. 72. 2017.
22. **Rocha EALSS, Medeiros ACD, Castro RD, Rosalen PL, Saraiva KLA et al.** Antifungal Activity, Phytochemical Characterization and Thermal Profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada* 2017;17:3389.
23. **Nunes LE, Viana APP, Rocha WRV, Cunha VDS, Catao RMR et al.** In vitro evaluation of antifungal activity and interactive effect of *Anadenanthera colubrina* (Benth). *African Journal of Microbiology Research* 2015;9:2006-2012.
24. **Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT et al.** Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014.
25. **Carvalho DDC, Alves E, Camargos RB, Oliveira DF, Scolforo JRS et al.** Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangerine fruits. *Rev Iberoam Micol* 2011;28;4:173–178.
26. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3rd edition, 2008;28; 14.
27. **Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV et al.** Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97;7:1027-1031.
28. **Mota GS, Sartori CJ, Miranda I, Quilhó T, Mori FA et al.** Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina* *Plos one* 2017;12;12.
29. **Araújo DRC, Silva LCN, Harand W, Fernandes JM, Soares TC et al.** Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. *Pharmacogn J* 2017;9;4.
30. **Silva LCN, Miranda RCM, Gomes EB, Macedo AJ, Araújo JM et al.** Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2013;7;32.
31. **Gutierrez-Lugo MT, Deschamps JD, Holman TR, Suarez E, Timmermann BN.** Lipoxigenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med* 2004;70;3.

32. **Belmokhtar Z, Harche MK.** In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss. *Natural Product Research* 2014;28;24.
33. **Alves CT, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Azeredo J et al.** Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiol* 2014;9:139–146.
34. **Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ACB, Khouri S et al.** Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol* 2015;10: 917–927.
35. **Hargrove TY, Friggeri L, Wawrzak Z, Qi A, Hoekstra WJ et al.** Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. *J. Biol. Chem* 2017;292:6728–6743.
36. **Li ZJ, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y et al.** Antifungal activity of gallic acid In Vitro and In Vivo. *Phytother. Res* 2017;31:1039–1045.
37. **Zuo Y, Chen H, Deng Y.** Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 2002;57:307–316.
38. **Saito H, Tamura M, Imai K, Ishigami T, Ochiai K.** Catechin inhibits *Candida albicans* dimorphism by disrupting Cek phosphorylation and cAMP synthesis. *Microbial Pathogenesis* 2013;56.
39. **Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM.** Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Vet Microbiol* 2011;150: 344–348.
40. **Franco W, Hsu WY, Simmone AH.** Survival of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Mexican red salsa in a food service setting. *J Food Prot* 2010;73:1116–1120.
41. **Bondaryk M, Kurzątkowski W, Staniszewska M.** Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postep Derm Alergol* 2013;5.
42. **Bakhshi M, Taheri JB, Shabestari SB, Tanik A, Pahlevan R.** Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. *Gerodontology* 2012;29;2:680–684.
43. **Bantel Y, Darwiche R, Rupp S, Schneider R, Sohn K.** Localization and functional characterization of the pathogenesis-related proteins Rbelp and Rbt4p in *Candida albicans*. *Plos One* 2018;13;8.
44. **Silva NC, Nery JM, Dias ALT.** Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses* 2014;57;1:1-11.
45. **Dabiri S, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M.** SAP(1-3) Gene expression in high proteinase producer *Candida* species strains isolated from Iranian patients with different Candidosis. *J Pure Appl Microbiol* 2016;10:1891–6.

46. **Mohan V, Ballal M.** Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:208–10.
47. **Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Santos JD, Jorge AOC et al.** Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Braz J Oral Sci* 2013;12:199–204.
48. **Costa EMMB, Santos AL, Cardoso AS, Portela MB, Abreu CM et al.** Heterogeneity of metallo and serine extracellular proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and health children from Rio de Janeiro. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003;38;67:173-180.
49. **Pereira FO, Mendes JM, Lima EO.** Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology* 2013;51:507–513.
50. **Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP.** Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998;62;1:130-180.
51. **Harrington BJ, Hageage JG.** Calcoflur white: A review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology. *Laboratory and Clinical Medicine* 2003;34:361–367.
52. **Kumamoto CA.** A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102;15:5576–5581.

5.2 PLANO DE ANÁLISE II

Artigo 2, a ser submetido para publicação no periódico Journal of Applied Oral Science, Qualis A2 (ANEXO B).

Potencial antitumoral e citotóxico do extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

Resumo

Objetivo: Investigar o potencial antitumoral do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* e suas frações sobre diferentes linhagens tumorais e o efeito citotóxico sobre linhagens celulares de queratinócitos, macrófagos, fibroblastos e pré-osteoblastos. **Materiais e Métodos:** O extrato foi obtido por maceração, concentrado a vácuo, liofilizado e, posteriormente, fracionado através de coluna filtrante em funil de placa porosa. Foi avaliada a atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações sobre sete linhagens de células humanas tumorais e duas não-tumorais através do método da Suforrodamina B. Os testes sobre fibroblastos e pré-osteoblastos foram realizados através do ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. **Resultados:** O extrato da *A. colubrina* apresentou efeito citostático inespecífico, com redução na proliferação celular para queratinócitos e todas as linhagens tumorais testadas, não sendo evidenciado efeito citocida até a concentração de 250 µg/mL. A fração diclorometano:metanol apresentou efeito citocida sobre as linhagens PC-3, NCI-H460 e NCI/ADR-RES e efeito citostático para as demais linhagens. Não foi verificado efeito citotóxico do extrato até as concentrações de 62,5 µg/mL para a linhagem de macrófagos RAW 264.7, 60 µg/mL para fibroblastos NIH3T3 e 90 µg/mL para pré-osteoblastos MC3TC-E1. **Conclusões:** O extrato bruto da casca da *A. colubrina* apresenta baixa toxicidade sobre linhagens de células humanas tumorais e não-tumorais, com efeito citocida importante sobre células tumorais através da sua fração diclorometano:metanol.

PALAVRAS-CHAVE: Phytotherapy. Antitumor agents. Toxicity test.

Introdução

O câncer, atualmente, é considerado como a segunda causa de morte no mundo e deve aumentar em 70% nas próximas duas décadas, sendo os cânceres de pulmão, fígado, estômago, colorretal, mama, próstata, esôfago e o carcinoma espinocelular correspondentes à maioria das mortes¹⁻³. A progressão tumoral está associada à instabilidade genômica, através do acúmulo de mutações para fatores envolvidos na proliferação celular, apoptose e reparo de DNA, entre outros⁴. A quimioterapia é uma estratégia comum de tratamento para o câncer avançado e metastático, porém os diversos efeitos colaterais negativos e o desenvolvimento de resistência a drogas anticâncer convencionais resultam em algumas limitações em sua aplicabilidade clínica, incentivando a busca por terapias alternativas⁵.

A utilização de compostos naturais com fins terapêuticos vem aumentando em todo o mundo, observando-se também o aumento na realização de pesquisas que investigam suas propriedades bioativas^{6,7}. Os produtos naturais são considerados como as principais fontes contribuintes para o arsenal de medicamentos antineoplásicos⁸. Aproximadamente metade (55%) das moléculas anticâncer aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos anos 1940 até o final de 2014 referem-se à produtos naturais ou seus derivados⁹.

Como organismos estacionários, as plantas desenvolvem diversos mecanismos de proteção para diminuição de sua vulnerabilidade contra ameaças externas, incluindo defesas químicas, representadas pela produção de vários metabólitos bioativos, a exemplo de taninos e flavonóides, compostos de grande interesse farmacológico^{6,10}. Neste cenário, destaca-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, espécie arbórea nativa de florestas subtropicais da América do Sul, bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias, como asma, bronquite, tosse e gripe, e como agente cicatrizante da pele e tratamento de processos inflamatórios^{11,12}. Esta planta pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, conhecida popularmente como “angico”^{13,14}.

Em estudo anterior, foi observado efeito citostático inespecífico do extrato da casca da *A. colubrina*, no qual constatou-se a sua capacidade de diminuir a proliferação de diferentes linhagens de células tumorais, sem evidências de atividade citocida¹⁵. A partir desses resultados, identificou-se a necessidade de fracionar o referido extrato, a fim de potencializar a sua atividade frente a essas linhagens. Para justificar a aplicabilidade de um produto ou composto natural com potencial antitumoral deve também ser observada baixa citotoxicidade às células humanas não-tumorais, como forma de preservar os tecidos normais¹⁶. Deste modo, este estudo avaliou, além do potencial antitumoral do extrato da casca da *A. colubrina* e suas frações sobre linhagens tumorais, o seu efeito citotóxico sobre linhagens celulares de queratinócitos, macrófagos, fibroblastos e pré-osteoblastos.

Materiais e Métodos

Material Vegetal

A casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foi coletada na região do semiárido paraibano, na Serra de Bodocongó, município de Queimadas (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W), mesoregião da Borborema e microrregião do Cariri Oriental, no mês de setembro. O espécime testemunho da planta encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba (n° 667/ACAM).

Foi obtido o extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina*, através de maceração por 48 horas, utilizando-se a proporção de 10mg da planta para 25mL de álcool etílico 80%¹⁷. Foram realizadas três filtrações e, em seguida, evaporação à vácuo e liofilização, obtendo-se um rendimento de 31,7%.

O perfil químico do extrato hidroalcoólico da *A. colubrina* foi definido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), sendo evidenciada predominância de compostos fenólicos, como flavonóides, ácido gálico, catequina e ácido caféico, além da presença de triterpenos.

Para o fracionamento do extrato foi realizada a partição sólido-líquido, em coluna cromatográfica filtrante em funil de placa porosa, de acordo com gradiente de polaridade: hexano, diclorometano, diclorometano:metanol (95:5, 90:10, 50:50), metanol e metanol:água (50:50). As frações resultantes foram monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e reunidas conforme o perfil de similaridade e colorações diante do revelador empregado e, em seguida, concentradas à vácuo.

Atividade Antitumoral

A atividade antitumoral do extrato e de suas frações foram avaliadas sobre as linhagens de células tumorais humanas U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon) e a linhagem não tumoral HaCat (queratinócito). As linhagens utilizadas no estudo foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI), Frederick, Maryland, EUA. Foram preparadas suspensões celulares em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina: estreptomicina. As suspensões foram inseridas em placas de 96 poços (100 µL/poço) e expostas ao extrato e às frações (0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL), diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), na concentração de 0,1 g/mL, e incubados por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Antes (placa T0) e após a adição das amostras (placa T), as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 50%. A proliferação celular foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor

de proteínas, utilizando Sulforrodamina B. O quimioterápico Doxorrubicina (0,1 mg/mg) foi utilizado como controle positivo.

Viabilidade Celular de Macrófagos RAW 264.7

Para análise da viabilidade celular de macrófagos foi desenvolvida a mesma metodologia do item anterior, utilizando uma suspensão de células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATTC, Manassa, VA, USA) e o extrato da *A. colubrina* nas seguintes concentrações: 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; 7,81 µg/mL; 3,91 µg/mL; 1,95 µg/mL; 0,98 µg/mL; 0,49 µg/mL e 0,24 µg/mL.

A viabilidade celular foi calculada através da equação: viabilidade celular (%) = $(A_{amostra}/A_{controle}) \times 100\%$, onde $A_{amostra}$ e $A_{controle}$ equivalem às absorbâncias das amostras com e sem a adição do tratamento, respectivamente.

Viabilidade Celular de Fibroblastos NIH3T3 e Pré-osteoblastos MC3T3-E1

Os fibroblastos NIH3T3 e os pré-osteoblastos MC3T3-E1 foram cultivados em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço. Foi realizada a avaliação da viabilidade celular e curvas de crescimento através do ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução de MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e NADH, que resulta na formação de cristais de formazan. Estes cristais são solubilizados através da adição de DMSO e a sua concentração é determinada por espectrofotometria, através da densidade óptica a 570nm. A quantidade de formazan é proporcional ao número de células viáveis. O extrato da *A. colubrina* foi testado nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL.

Análise Estatística

Para a atividade antiproliferativa, através da curva concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI_{50} (concentração necessária da amostra para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear, usando software Origin 8.0 (OriginLab Corporation)^{18,19}.

Os dados da viabilidade celular foram tabulados e analisados estatisticamente no programa Statistical Package for Social Sciences v. 20 (SPSS Statistics, v. 20, IMB, Chicago, IL). Inicialmente, os dados da citotoxicidade sobre macrófagos foram avaliados quanto a sua distribuição, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, utilizou-se a análise de variância a um critério fixo (ANOVA one-way) e análise post-hoc pelo teste de Tukey. Para os resultados da citotoxicidade sobre fibroblastos e pré-osteoblastos, a análise foi não-paramétrica. Foi realizado o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os produtos

testados foram considerados como fator de estudo e o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Nos experimentos sobre a atividade antiproliferativa, a doxorrubicina apresentou efeito citocida sobre todas as linhagens testadas (Figura 1). O extrato bruto da *A. colubrina* apresentou efeito citostático inespecífico, observando-se redução na proliferação celular para todas as linhagens testadas, não sendo evidenciado efeito citocida até a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2). A fração diclorometano:metanol apresentou efeito citocida sobre as linhagens NCI/ADR-RES, PC-3 e NCI-H460 e efeito citostático para as demais linhagens testadas (Figura 3). As frações metanólica e hidrometanólica não apresentaram ação sobre as linhagens testadas (Figuras 4 e 5). A atividade antiproliferativa do extrato e suas frações foi expressa em GI_{50} , cujos dados estão expressos na Tabela 1.

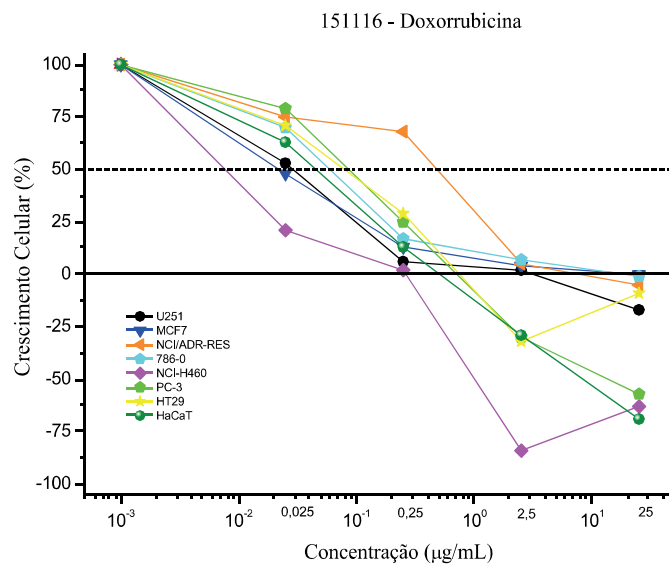


Figura 1. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) após 48 horas de exposição ao quimioterápico Doxorrubicina (controle positivo).

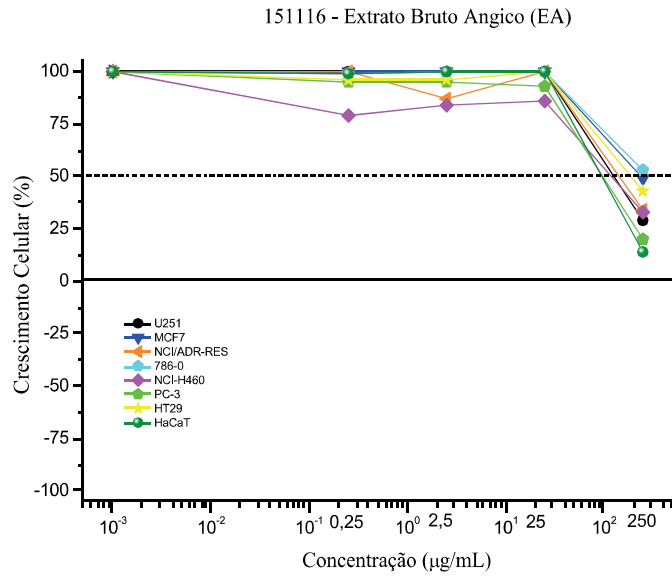


Figura 2. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição ao extrato bruto da *A. colubrina*.

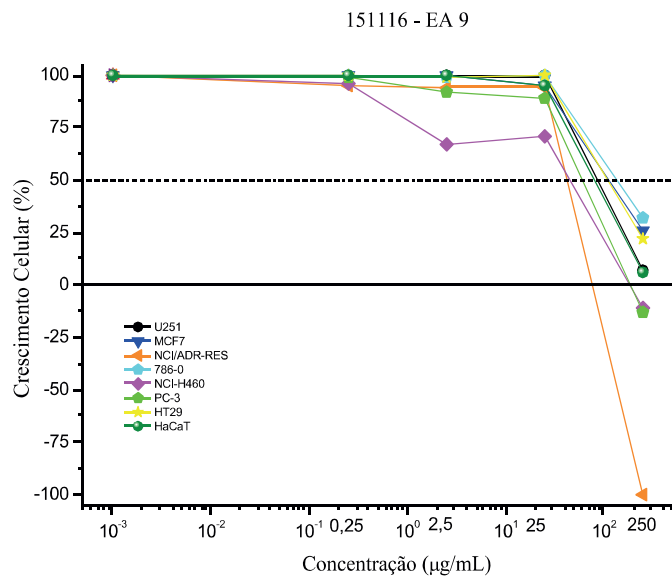


Figura 3. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração diclorometano:metanol do extrato da *A. colubrina*.

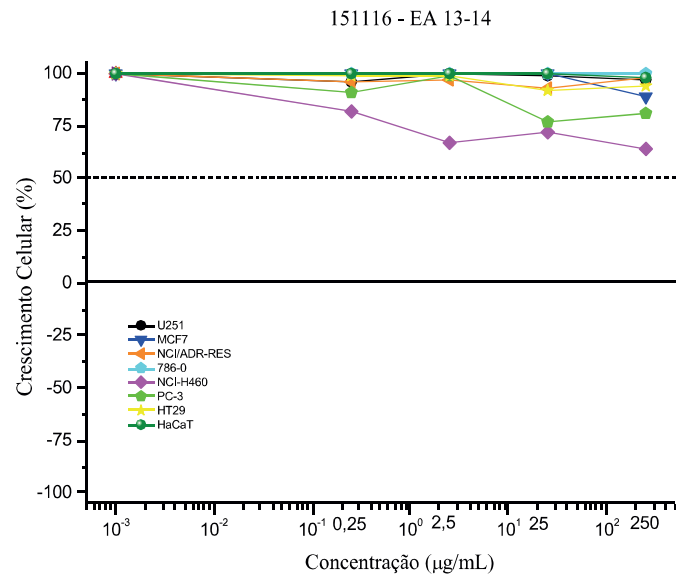


Figura 4. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração metanólica do extrato da *A. colubrina*.

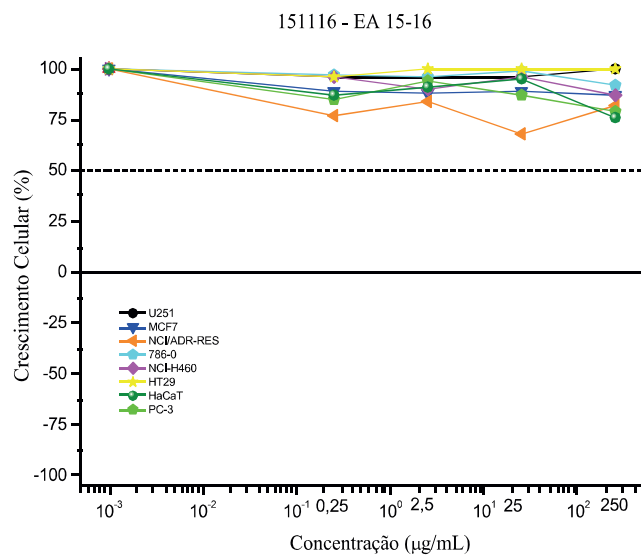


Figura 5: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração hidrometanólica do extrato da *A. colubrina*.

Tabela 1. Valores de GI_{50} (*Growth Inhibition 50* – concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) do extrato da *A. colubrina* e de suas frações sobre cultura de células humanas tumorais e não-tumoral.

	Doxorrubicina	<i>A. colubrina</i>	Fração diclorometano: metanol	Fração metanólica	Fração hidrometanólica
U251 (Glioma)	0,03	217,25	198,56	> 250	> 250
MCF-7 (Mama)	< 0,025	249,13	136,73	> 250	> 250
NCI-ADR/RES (Ovário resistente)	0,36	231,78	33,68	> 250	> 250
786-0 (Rim)	0,06	>250	219,06	> 250	> 250
NCI-H460 (Pulmão)	< 0,025	122,82	28,21	> 250	> 250
PC-3 (Próstata)	0,08	111,29	32,17	> 250	> 250
HT-29 (Cólon)	0,07	242,25	221,62	> 250	> 250
HaCat (Queratinócito)	0,04	211,25	82,20	> 250	> 250
Mean log GI_{50}	< -1,03	2,30	2,09	> 2,39	>2,39

Em relação à citotoxicidade frente a macrófagos RAW 264.7, o extrato da *A. colubrina* não apresentou perfil citotóxico até a concentração de 62,5 µg/mL, observando-se a manutenção da viabilidade celular acima de 80% até esta concentração (Figura 6). As células que ficaram em contato com a *A. colubrina* na concentração de 125 µg/mL apresentaram redução de viabilidade celular, com taxa de sobrevivência em torno de 60%, observando-se diferença estatisticamente significativa quando comparada às demais concentrações ($p < 0,05$).

Os testes de citotoxicidade em fibroblastos NIH3T3 indicam que a viabilidade celular se manteve semelhante à do controle negativo (concentração de 0 µg/mL) até a concentração de 60 µg/mL ($p > 0,05$). Para as concentrações subsequentes, observou-se redução significativa na viabilidade celular em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 7). Em pré-osteoblastos MC3T3-E1 observou-se viabilidade celular em torno de 80% até a concentração de 90 µg/mL, sendo verificado comportamento semelhante ao controle negativo até esta concentração ($p > 0,05$). Apenas para a concentração de 100 µg/mL observou-se diferença estatística em relação ao controle negativo, indicando citotoxicidade a partir desta concentração ($p < 0,05$) (Figura 8).

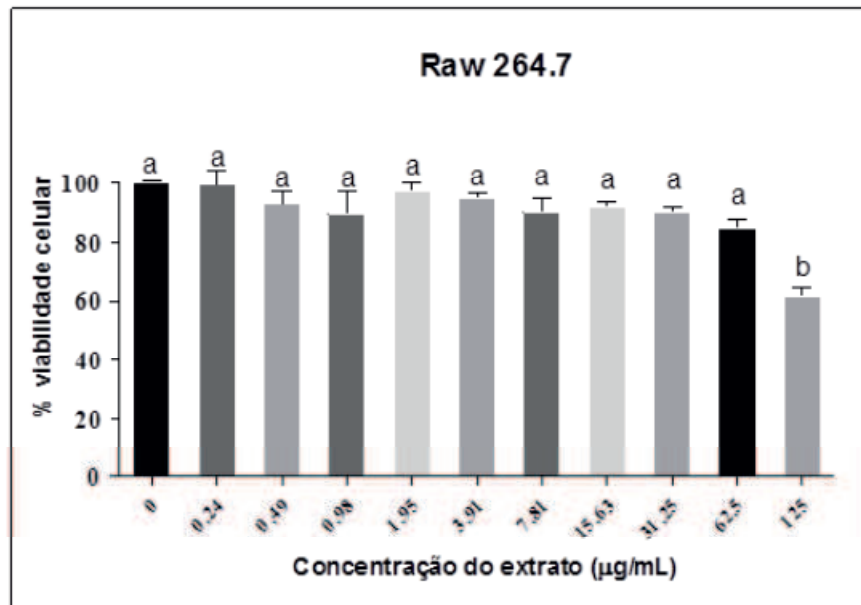


Figura 6. Distribuição do percentual médio de viabilidade celular de linhagem de macrófagos RAW 264.7 de acordo com a concentração do extrato da *A. colubrina*.

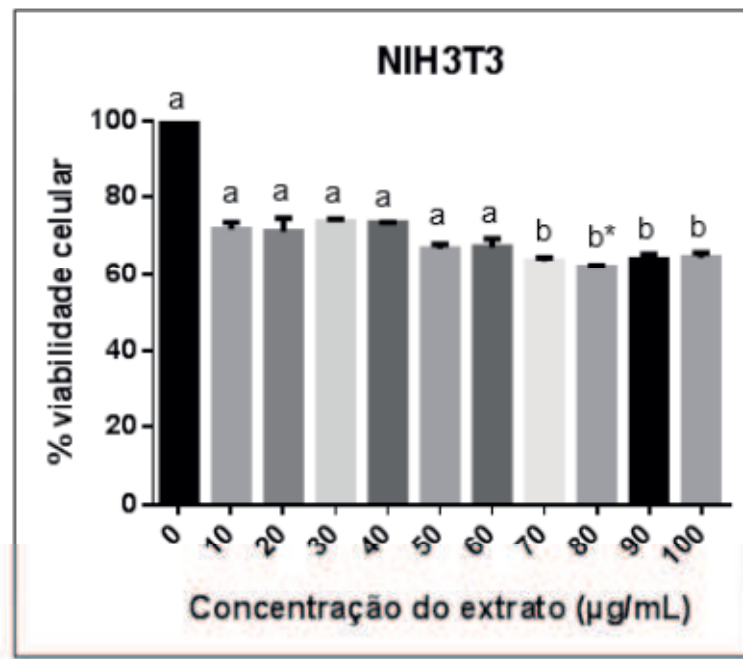


Figura 7. Distribuição do percentual médio de viabilidade celular de linhagem de fibroblastos NIH3T3 de acordo com a concentração do extrato da *A. colubrina*. *($p < 0,01$)

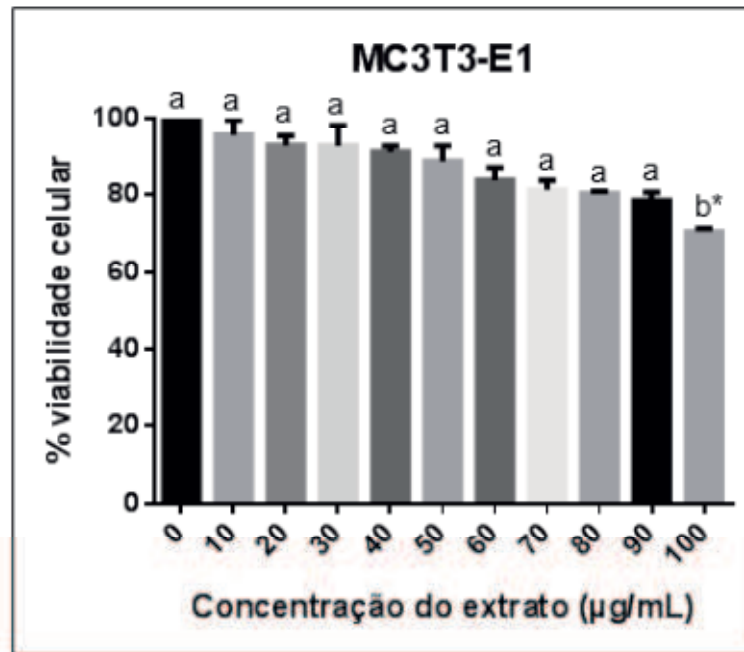


Figura 8. Distribuição do percentual médio de viabilidade celular de linhagem de pré-osteoblastos MC3T3-E1 de acordo com a concentração do extrato da *A. colubrina*. *($p < 0,01$)

Discussão

Considerando os critérios utilizados pelo NCI (Instituto Nacional do Câncer), em que amostras com $\log GI_{50}$ maior que 1,5 não apresentam atividade anticâncer, $\log GI_{50}$ entre 1,1 e 1,5 apresentam fraca atividade, $\log GI_{50}$ entre 0 e 1, moderada atividade e $\log GI_{50}$ menor que zero, potente atividade²⁰, confirma-se a ausência de atividade antitumoral do extrato da *A. colubrina*¹⁵, cuja média de $\log GI_{50}$ foi 2,30. Por outro lado, esta atividade foi potencializada a partir do fracionamento do extrato, onde se verificou efeito citocida da fração diclorometano:metanol sobre as linhagens PC-3, NCI-H460 e, principalmente, NCI/ADR-RES. Destaca-se a NCI/ADR-RES por corresponder à linhagem de células tumorais ovarianas com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, sendo uma das linhagens menos sensível à doxorrubicina²¹. Essa resistência deve-se a mecanismos intracelulares e barreiras extracelulares que impedem a entrada dos fármacos, sendo fundamental o uso de terapias que visem caminhos independentes para driblar os mecanismos de resistência aos agentes quimioterápicos padrão²².

O efeito citocida apenas da partição diclorometano:metanol do extrato da *A. colubrina* indica a concentração dos compostos bioativos nesta fração com efeito sinérgico. Para uma melhor compreensão dos mecanismos dessa bioatividade, torna-se necessário o isolamento dos compostos e a realização de estudos de modulação e interação com a célula hospedeira²³. Em contrapartida, a inatividade apresentada pelo extrato bruto, frente a todas

as linhagens celulares, pode ser resultante da presença de compostos com efeitos antagônicos na atividade antiproliferativa.

Os compostos fenólicos identificados no extrato, como os flavonoides, são importantes compostos bioativos. Dentre as suas propriedades biológicas, destaca-se a ação antioxidante, caracterizada pela capacidade de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desempenham um papel crítico no desenvolvimento do câncer por induzirem mutações de DNA^{24,25}. Dessa forma, os fenóis são considerados agentes quimioprotetores, capazes de promover a parada ou a regressão do processo de câncer²⁶.

O ácido gálico representa outro composto fenólico, também identificado no extrato da *A. colubrina*, cujos derivados estão relacionados a atividades antitumorais seletivas. Tais atividades incluem indução de apoptose em linhagens de células tumorais, através da ativação da via apoptótica dependente de mitocôndrias. Sua atividade está associada ao metabolismo oxidativo mitocondrial alterado e aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, como também liberação de citocromo C, fator indutor de apoptose^{27,28}. Estudos divulgaram os efeitos antitumorais específicos do ácido gálico em uma variedade de tumores humanos e murinos, em linhagens de leucemia, pulmão, estômago, cólon, melanoma, mama, feocromocitoma e fibrossarcoma²⁸⁻³⁴. Em estudo anterior, verificou-se também a sensibilidade da linhagem celular NCI-H460 à apoptose induzida pelo ácido gálico³⁵.

O perfil não citotóxico do extrato da *A. colubrina* sobre as linhagens de células não tumorais, como os queratinócitos (HaCat), constitui-se um achado relevante no que diz respeito a utilização deste extrato para o desenvolvimento de uma possível forma farmacêutica de uso tópico^{36,37}. Ressalta-se, também, a importância clínica e farmacológica dos achados que revelaram baixa citotoxicidade do extrato frente às linhagens de macrófagos RAW 264.7, fibroblastos NIH3T3 e pré-osteoblastos MC3T3-E1. Os fibroblastos, por exemplo, são as principais células produtoras de colágeno e, portanto, participam ativamente do processo de reparo tecidual, sendo os principais componentes do tecido conjuntivo denso³⁸. A redução da viabilidade celular observada em determinadas concentrações pode ter sido resultante da inibição da proliferação celular e não necessariamente da morte celular³⁹.

Além de não ser tóxico aos macrófagos, existem relatos de que a goma da *A. colubrina*, material extraído da sua casca, possui compostos capazes de ativar estas células⁴⁰. Os macrófagos possuem um papel crítico na resposta imune, uma vez que possuem a função de destruir microrganismos e células tumorais. O modelo de viabilidade de macrófagos *in vitro* representa uma ferramenta de triagem útil para identificar a toxicidade relativa das substâncias, reduzindo os testes de toxicidade em animais⁴¹.

As células pré-osteoblásticas foram utilizadas para observar a interferência do extrato da *A. colubrina* no processo de viabilidade dos osteoblastos. Os osteoblastos expressam

fatores osteoblastogênicos, responsáveis pela formação de proteínas da matriz óssea e mineralização óssea⁴². Os compostos fenólicos do extrato, com reconhecida ação antioxidante, podem ter inibido a liberação de ROS, justificando a baixa interferência na viabilidade celular dessas células. Sabe-se que o estresse oxidativo, resultante de níveis excessivos de ROS, inibe a diferenciação osteogênica das células estromais da medula óssea, das células osteoprogenitoras e dos osteoblastos, constituindo uma das principais causas de dano e morte celular em uma infinidade de condições patológicas, incluindo osteoporose^{43,44}.

Considerando a baixa toxicidade do extrato da *A. colubrina* frente as células não tumorais humanas e o efeito citocida da fração diclorometano:metanol sobre algumas linhagens de células tumorais, sugere-se o isolamento e identificação do(s) composto(s) responsável(is) pela bioatividade e a realização de modulação celular para comprovação do seu potencial antitumoral, principalmente sobre a linhagem NCI/ADR-RES, devido ao seu perfil de múltipla resistência.

Conclusão

O extrato bruto da casca da *A. colubrina* apresenta baixa citotoxicidade sobre linhagens de células não tumorais humanas e efeito citostático inespecífico contra linhagens tumorais, com efeito citocida sobre as linhagens PC-3, NCI-H460 e NCI/ADR-RES através da sua fração diclorometano:metanol.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento deste estudo, através da chamada Pública MCTI/CNPq/MEC/Capes – Ação Transversal nº06/2011 – Casadinho/Procad (Convênio Federal Casadinho/Procad, Nº 552561/2011-8 do CNPq/MCT e Capes/MEC).

REFERÊNCIAS

- 1- World Health Organization, Cancer, 2018, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- 2- International Agency for Research on Cancer, Cancer Fact Sheets: All Cancers excluding Non-Melanoma Skin, 2012, <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=29&type=0&sex=0>.
- 3- Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. Surg. Oncol. Clin. N. Am. 2015;24: 491–508.

- 4- Ferguson LR, Chen H, Collins AR. Genomic instability in human cancer: molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35:S5–S24.
- 5- Kumnerdkhonkaen P, Saenglee S, Asgar MA, Senawong G, Khongsukkiwat K, Senawong T. Antiproliferative activities and phenolic acid content of water and ethanolic extracts of the powdered formula of *Houttuynia cordata* Thunb. Fermented broth and *Phyllanthus emblica* Linn. fruit. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1):130.
- 6- Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, Cabral C, Pires IM. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018.
- 7- Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014;62:250–264.
- 8- Karmahapatra S, Kientz C, Shetty S, Yalowich JC, Rakotondraibe LH. Capsicodendrin from *Cinnamosma fragrans* Exhibits Antiproliferative and Cytotoxic Activity in Human Leukemia Cells: Modulation by Glutathione. *J Nat Prod*. 2018;81(3):625-629.
- 9- Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod*. 2016;79:629–661.
- 10- Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M, Bak S. Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(5):10242–10297.
- 11- Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2010;131:326–342.
- 12- Agra MDF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2008;18(3):472–508.
- 13- Garcia MV, Prinz K, Barrandeguy ME, Miretti M, Finkeldey R. A unifying study of phenotypic and molecular genetic variability in natural populations of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* from Yungas and Paranaense biogeographic provinces in Argentina. *Journal of Genetics*. 2014;93(1).
- 14- Nepomuceno CF, Rios APDS, Queiroz SRDOD, Pelacani CR, Santana JRF. Controle da abscisão foliar e morfogênese in vitro em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*. 2007;31(5):967–975.

- 15- Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT, Góes VFF et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014.
- 16- Carvalho NC, Guedes SAG, Albuquerque-Junior RLC, Albuquerque DS, Souza Araújo AA, Paranhos LR et al. Analysis of Aloe vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser photobiomodulation. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B. Biology*. 2018;178:348–354.
- 17- Carvalho DDC, Alves E, Camargos RB, Oliveira DF, Scolforo JRS, Carvalho DA et al. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Rev Iberoam Micol*. 2011;28(4):173–178.
- 18- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst*. 1991;83(11):757-766.
- 19- Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*. 2006;6(10):813-823.
- 20- Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, Senabe J. In vitro anticancer screening of South African plants. *J. Ethnopharmacol*. 2008;119(3):455-461.
- 21- Qin M, Lee YE, Ray A, Kopelman R. Overcoming cancer multidrug resistance by codelivery of doxorubicin and verapamil with hydrogel nanoparticles. *Macromolecular bioscience*. 2014;14(8):1106–1115.
- 22- Vert A, Castro J, Ribó M, Vilanova M, Benito A. Transcriptional profiling of NCI/ADR-RES cells unveils a complex network of signaling pathways and molecular mechanisms of drug resistance. *OncoTargets and Therapy*. 2018;11:221–237.
- 23- Caamal-Herrera IO, Muñoz-Rodríguez D, Madera-Santana T, Azamar-Barrios JA. Identification of volatile compounds in essential oil and extracts of *Ocimum micranthum* Willd leaves using GC/MS. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2016;9(1):31–40.
- 24- Namvar F, Mohamad R, Baharara J, Zafar-Balanejad S, Fargahi F, Rahman HS. Antioxidant, Antiproliferative, and Antiangiogenesis Effects of Polyphenol-Rich Seaweed (*Sargassum muticum*). *BioMed Research International*. 2013;2013.
- 25- Kampa M, Nifli A, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews of Physiology*. 2007;159:79–113.

- 26- Nivelles L, Aires V, Rioult D, Martiny L, Tarpin M, Delmas D. Molecular analysis of differential antiproliferative activity of resveratrol, epsilon viniferin and labruscol on melanoma cells and normal dermal cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;16:323–334.
- 27- Jara JA, Castro-Castillo V, Saavedra-Olavarria J, Peredo L, Pavanni M, Jaña F et al. Antiproliferative and Uncoupling Effects of Delocalized, Lipophilic, Cationic Gallic Acid Derivatives on Cancer Cell Lines. Validation in Vivo in Singenic Mice. *J. Med. Chem.* 2014;57:2440–2454.
- 28- Yeh RD, Chen JC, Lai TY, Yang JS, Yu CS, Chiang JH et al. Gallic acid induces G(0)/G(1) phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res.* 2011;31:2821– 2832.
- 29- Heijnen CG, Haenen GR, Vekemans JA, Bast A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2001;10: 199–206.
- 30- Frey C, Pavani M, Cordano G, Munoz S, Rivera E, Medina J et al. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;146:520–527.
- 31- Campos AM, Ponce E, Lissi EA. Effects of alkyl chain lengths of gallates upon their distribution and reactivity towards diphenylpicrylhydracil radicals in Triton X-100 micellar solutions. *J. Phys. Org. Chem.* 2009;22:1208–1211.
- 32- Campos A, Villalobos C, Lissi E. Reaction of alkyl gallates with diphenyl picrylhydracil radicals in SDS micelles. *J. Chil. Chem. Soc.* 2010;55:458–460.
- 33- Bridi R, Aliaga C, Aspee A, Abuin E, Lissi E. Distribution and reactivity of gallates toward galvinoxyl radicals in SDS micellar solutions effect of the alkyl chain length. *Can. J. Chem.* 2011;89:181–185.
- 34- Cordova CAS, Locatelli C, Assuncao LS, Mattei B, Mascarello A, Winter E et al. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. *Toxicol. Vitro.* 2011;25:2025–2034.
- 35- Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J Agric Food Chem.* 2009;57(16):7596-604.
- 36- Marques TZS, Santos-Oliveira R, Siqueira LBO, Cardoso VDS, Freitas ZMF, Barros RCDSA et al. Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine.* 2018;13:2827–2837.

- 37- Arranja A, Schroder AP, Schmutz M, Waton G, Schosseler F, Mendes E. Cytotoxicity and internalization of pluronic micelles stabilized by core cross-linking. *J Control Rel.* 2014;28(196):87–95.
- 38- Chari RVJ, Farias MP, Matos F, Carvalho NC, Almeida RP, Mendonça AAM et al. Assessment of intracanal medications cytotoxicity on L929 fibroblast cells. *Biosci. J.* 2016;32(2):566–573.
- 39- Wysokinska E, Cichos J, Ziolo E, Bednarkiewicz A, Strzadala L, Karbowski M et al. Cytotoxic interactions of bare and coated NaGdF₄:Yb³⁺:Er³⁺nanoparticles with macrophage and fibroblast cells. *Toxicol In Vitro.* 2015.
- 40- Moretão MP, Zampronio AR, Gorin PAJ, Iacomini M, Oliveira MB. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL). *Immunology Letters.* 2004;93:189–197.
- 41- Gwinn WM, Qu W, Bousquet RW, Price H, Shines CJ, Taylor GJ et al. Macrophage Solubilization and Cytotoxicity of Indium-Containing Particles as in vitro Correlates to Pulmonary Toxicity in vivo. *Toxicological Sciences.* 2015;144(1):17–26.
- 42- Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.* 2010;285:25103–25108.
- 43- Lee YH, Kang YM, Heo MJ, Kim GE, Bhattarai G, Lee NH et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells. *J. Endod.* 2013;39(2):236–241.
- 44- Forrest CM, Mackay GM, Oxford L, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Kynurenine pathway metabolism in patients with osteoporosis after two years of drug treatment. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2005;33:1078–1087.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan possui forte atividade anticandida e ação inibitória sobre biofilme *in vitro* de *Candida albicans*. Provavelmente, interage com componentes da parede celular, provocando modificações na sua estrutura celular, visualizadas morfológicamente. O extrato não apresenta efeito citotóxico sobre as linhagens celulares normais na maioria das concentrações estudadas. Por outro lado, o seu fracionamento potencializou a sua atividade antiproliferativa sobre algumas linhagens de células tumorais. Essas bioatividades, possivelmente, são resultantes da ação dos compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácido gálico, catequina e ácido cafêico, e triterpenos, identificados no extrato.

Além dos métodos apresentados neste trabalho, foram realizados ensaios para avaliar: 1) a interação do extrato da *A. colubrina* com o ergosterol da membrana celular da *Candida albicans*; 2) o perfil proteolítico da *C. albicans* após o tratamento com o extrato; e 3) a atividade antioxidante do extrato. No entanto, as dificuldades na padronização destes métodos decorreram na obtenção de resultados pouco consistentes e, portanto, não apresentados. Ajustes metodológicos estão sendo realizados, cujos resultados serão futuramente apresentados.

Diante dos resultados encontrados, sugerem-se para as próximas fases deste trabalho testes de modulação celular e de interação da *Candida* com a célula hospedeira, após o tratamento com o extrato da *A. colubrina*, assim como, análises sobre a eficácia clínica do extrato em modelos *in vivo* de candidose oral.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Chamada Pública MCTI/CNPq/MEC/Capes – Ação Transversal nº06/2011 – Casadinho/Procad (Convênio Federal Casadinho/Procad, Nº 552561/2011-8 do CNPq/MCT e Capes/MEC). Projeto: “Caracterização e potencial bioativo de extratos de plantas da região do semiárido, com perspectivas de desenvolvimento de formulações farmacêuticas”.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M.; ELHASSAN, G.O.; YAGI, S. et al. In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of 18 Plants from the Erkowit Region, Eastern Sudan. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 8, 2018.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASILIO, I.J.L.D. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, p. 472–508, 2008.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, p.114–140, 2007.
- ALEXANDRE, R.F.; GARCIA, F.N.; SIMÕES, C.M.O. Evidence-based herbal medicine. Part 2. Phytopharmaceuticals elaborated with artichoke, horse chestnut, ginseng and passion flower. *Acta Farm. Bonaer*, v. 24, p. 310–314, 2005.
- ALGHAMDI, S; ATEF SHEBL, N.; ASLANPOUR, Z. et al. Hospital Adoption of Antimicrobial Stewardship Programmes in Gulf Cooperation Council Countries: A Review of Existing Evidence. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018.
- ARAÚJO, D.R.C.; SILVA, L.C.N.; SILVA, A.G. et al. Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, n. 28, 2014.
- ARAÚJO, T.A.S.; CASTRO, V.T.N.A.; SOLON, L.G.S. et al. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 550–556, 2015.
- ARAÚJO, D.R.C.; SILVA, L.C.N.; HARAND, W. et al. Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. *Pharmacogn J.*, v. 9, n. 4, 2017.
- BANDARA, H.M.H.N.; MATSUBARA, V.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 15, n. 3, p. 299–318, 2017.

BEN-AMI, R.; ZIMMERMAN, O.; FINN, T. et al. Heteroresistance to fluconazole is a continuously distributed phenotype among candida glabrata clinical strains associated with in vivo persistence. *MBio*, v. 7, n. 4, 2016.

BONDARYK, M.; KURZĄTKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postep Derm Alergol*, v. 5, 2013.

CARS, O.; HEDIN, A.; HEDDINI, A. The global need for effective antibiotics-moving towards concerted action. *Drug Resist. Updat.*, v. 14, p. 68-69, 2011.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol.*, v. 131, p. 326–342, 2010.

CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R.B. et al. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 28, n. 4, p. 173–178, 2011.

CARVALHO, N.C.; GUEDES, S.A.G.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C. et al. Analysis of Aloe vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser photobiomodulation. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B. Biology*, v. 178, p.348–354, 2018.

CAVALCANTI, Y.W.; MORSE, D.J.; SILVA, W.J. et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, v. 31, n. 1, p. 27-38, 2015.

CHARI, R.V.J.; FARIAS, M.P.; MATOS, F. et al. Assessment of intracanal medications cytotoxicity on L929 fibroblast cells. *Biosci. J*, v. 32, n. 2, p. 566–573, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, vol. 28, no. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3^a edição, 2008.

CORONADO-CASTELLOTE, L.; JIMENEZ-SORIANO, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v. 5, n. 5, p. 279–286, 2013.

FENINI, G.; GROSSI, S.; CONTASSOT, E. et al. Genome editing of human primary keratinocytes by CRISPR/Cas9 reveals an essential role of the NLRP1 inflammasome in UVB sensing. *J Invest Dermatol*, 2018.

FIRAT, Y.H.; SIMANSKI, M.; RADEMACHER, F. et al. Infection of Keratinocytes with *Trichophyton rubrum* Induces Epidermal Growth Factor-Dependent RNase 7 and Human Beta-Defensin-3 Expression. *Plos One*, v. 9, n. 4, 2014.

FREITAS-FERNANDES, F. S.; CAVALCANTI, Y.W.; RICOMINI FILHO A.P. et al. Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly(methyl methacrylate) resins: An in vitro study. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 112, n. 6, p. 1349-55, 2014.

GOW, N.A.; VAN DE VEERDONK, F.L.; BROWN, A.J. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, p. 112–122, 2011.

GRANATO, D.; OLIVEIRA, C.C.; CALADO, V.M.A. et al. Statistical approaches to assess the association between phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, v. 55, n. 10, 2015.

GUTIERREZ-LUGO, M.T.; DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R. et al. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med*, v. 70, n.3, 2004.

JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M. et al. Diagnóstico da pesquisa em diagnóstico no Brasil. *Revista USP* 89, p. 114-133, 2011.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol*, v. 14, p. 246-251, 2011.

KUMAMOTO CA. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 102, n. 15, p. 5576–5581, 2005.

KUMNERDKHONKAEN, P.; SAENGLER, S.; ASGAR, M.A. et al. Antiproliferative activities and phenolic acid content of water and ethanolic extracts of the powdered formula of *Houttuynia cordata* Thunb. Fermented broth and *Phyllanthus emblica* Linn. fruit. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 18, n. 130, 2018.

LAZARINI, J.G.; SARDI, J.C.O.; FRANCHIN, M. et al. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. *Biomed Pharmacother*, v. 102, p. 132-139, 2018.

LIMA, R.F.; ALVES, E.P.; ROSALEN, P.L. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

LUKASZUK, C.; KRAJEWSKA-KULAKA, E.; KULAK, W. Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015. *Peer J*, 2017.

MARTINS, N.; FERREITA, I.C.F.R.; BARROS, L. et al. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*, v. 177, p. 223-240, 2014.

MELO, M.N.O.; OLIVEIRA, A.P.; WIECIKOWSKI, A.F. et al. Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 26, p. 311-322, 2018.

MIRANDA-CADENA, K.; MARCOS-ARIAS, C.; MATEO, E. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. *Archives of Oral Biology*, v. 95, 2018.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MONTEIRO, J.M.; ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. et al. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, n. 6, 2006.

MOTA, G.S.; SARTORI, C.J.; MIRANDA, I. et al. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. *Plos One*, v. 27, 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, v. 75, p. 311-335, 2012.

NUNES, L.E.; VIANA, A.P.P.; ROCHA, W.R.V. et al. In vitro evaluation of antifungal activity and interactive effect of *Anadenanthera colubrina* (Benth). African Journal of Microbiology Research, v. 9, p. 2006-2012, 2015.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; MESSER, S.A. et al. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 31, p. 327-332, 1998.

PIEREN, M.; TIGGES, M. Adjuvant strategies for potentiation of antibiotics to overcome antimicrobial resistance. Curr. Opin. Pharmacol., v. 12, p. 551-555, 2012.

RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. J. Biol. Chem, v. 285, p. 25103–25108, 2010.

RASTEIRO, V.M.C.; COSTA, A.C.; ARAÚJO, C.F. et al. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. BMC Complement Altern Med., v. 14, p. 489, 2014.

ROCHA, E.A.L.S.S.; MEDEIROS, A.C.D.; CASTRO, R.D. et al. Antifungal Activity, Phytochemical Characterization and Thermal Profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, v. 17, 2017.

RODEIRO, I; CANCINO, L.; GONZÁLEZ, J.E. *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. Food and Chemical Toxicology, v. 44, n. 10, p. 1707-1713, 2006.

SÁNCHEZ, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci Technol Int., v. 8, p. 121-137, 2002.

SANGLARD D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. Frontiers in Medicine, v. 3, n. 11, 2016.

SENAWONG, T.; MISUNA, S.; KHAOPHA, S. et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitory and antiproliferative activities of phenolic-rich extracts derived from the rhizome of *Hydnophytum formicarum* Jack.: sinapinic acid acts as HDAC inhibitor. BMC Complement Altern Med., v. 13, 2013.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature reviews Cancer*, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SILVA, L.C.N.; SANDES, J.M.; PAIVA, M.M. et al. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 2012.

SILVA, L.C.N.; MIRANDA, R.C.M.; GOMES E.B. et al. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.

SILVA, D.R. Potencial Antifúngico e Antibiofilme Contra Espécies de Candida e Toxicidade da Anadenanthera colubrina vell. Brenan. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, p. 72. 2017.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOLDATI, G.T.; ALBUQUERQUE, U.P. Impact assessment of the harvest of a medicinal plant (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) by a rural semi-arid community (Pernambuco), northeastern Brazil. *Int. J. Biodivers. Sci. Ecosyst. Serv. Manage*, v. 63, p. 106-118, 2010.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.

SUCHAL. K.; MALIK, S.; GAMAD, N. et al. Kampeferol protects against oxidative stress and apoptotic damage in experimental model of isoproterenol-induced cardiac toxicity in rats. *Phytomedicine*, v. 23, p. 1401–1408, 2016.

TRIANA, L.E.; CARVAJAL, S.M. Protective effect of Galantamine against oxidative damage using human Lymphocytes: a novel in vitro model. *Arch Med Res*, v. 44, 2013.

TSAI, F.H.; KROL, A.A.; SARTI, K.E. et al. Candida glabrata PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 1384-1392, 2006.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*, v. 33, p. 643-675, 2015.

ZAIDI, K.U.; MANI, A.; THAWANI, V. et al. Total protein profile and drug resistance in *Candida albicans* isolated from clinical samples. *Molecular Biology International*, 2016.

ANEXOS

Information for Authors

Contents

- [1. General information](#)
- [2. Editorial processes](#)
- [3. Ethics and research integrity](#)
- [4. How to prepare your article](#)
- [5. Pre-submission checklists](#)
- [6. How to submit a standard research article](#)
- [7. References](#)
- [8. Tables](#)
- [9. Figures](#)
- [10. Supplementary material](#)
- [11. How to submit a revised article](#)
- [12. Author forms](#)
- [13. Post-acceptance](#)

1. General information

All articles must be submitted online using the Editorial Manager manuscript submission system. Please visit the Microbiology Society's [publications list](#) to choose the journal you wish to directly submit to, and follow the 'Submit now' link to access Editorial Manager. Submissions are not accepted in hard copy or by email. When using the Editorial Manager submission system, once the author has provided a title for their submission, they can exit the system and continue submitting it at another time, without needing to 'save' it. The author will find their unfinished submission in the 'Incomplete Submissions' folder on their Main Menu.

All pre-submission or general editorial queries should be directed to each journal's Editorial Office contact at:

- micro@microbiologysociety.org
- jgv@microbiologysociety.org
- jmm@microbiologysociety.org
- jmmcr@microbiologysociety.org
- mgen@microbiologysociety.org
- ijsem@microbiologysociety.org

The scope for each journal can be found by following the relevant link below. There you will find information about the types of articles that are considered for publication and the subject categories that are covered by that journal.

Microbiology

Journal of General Virology

Journal of Medical Microbiology

JMM Case Reports

Microbial Genomics

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

[Back to contents list](#)

2. Editorial processes

2.1 Editorial quality check

Upon submission, articles are checked by a member of the Editorial Office to ensure language quality, and that they are compliant with the [pre-submission checklists](#) as well as the requirements of the Society's Information for Authors. If any formatting problems are noticed by editorial staff, articles will be returned to the submitting author to amend before it can be assigned to an Editor.

2.2 Peer Review

Once an article has been assigned to an appropriate Editor, the Editor is then responsible for making the decision on the article's suitability for the journal, based on the journal scope. Editors are entitled to pre-screen reject submissions at this stage based on the nature of the study, quantity and quality of data, general conclusions, standard of presentation, language quality and if the article falls outside of the journal's scope.

Articles that pass the pre-screening stage will be sent to typically two independent reviewers. Reviewers will review the paper for originality and significance of the work described, and judge its acceptability for publication. The reviewers may also make critical comments and, where necessary, suggest improvements or additional experiments that could be done in support of the findings.

If the Editor is facing difficulty in obtaining reviewers, then he/she may also act as a reviewer or seek comments from another Editor. Authors may suggest at least three reviewers upon submitting their paper, ensuring that an institutional email address is provided. The use of reviewers suggested by the authors is at the discretion of the Editor after checks have been made to validate the suggested reviewers' details and authenticity.

2.3 Decisions

After reviewer recommendations have been obtained, it is the Editor who makes the final decision as to the acceptability of the article, based on the reviews and their own assessment of the article.

There are three possible decision types: accept, revise (major or minor) and reject. Revise decisions imply that the article requires modifications that could be carried out within a specified time frame.

Articles are reviewed as quickly as possible, and authors should usually expect to receive a first decision within 4-6 weeks.

[Back to contents list](#)

3.Ethics and research integrity

The Microbiology Society is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) and its editors operate within the COPE Code of Conduct for Journal Editors. The Society promotes the COPE International Standards for responsible research publication for authors and Editors. Common reasons for investigation include suspected instances of: Redundant (duplicate) publication; Plagiarism; Breach of copyright; Fabricated data; Problems with authorship; Undisclosed conflict of interest; Appropriation of ideas or data by a reviewer.

The Microbiology Society supports the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

For more information on the Society's Ethics Policies please see [6.7.4](#)

3.1 Originality and authorship

3.1.1 Originality

Research papers submitted to the Microbiology Society's journals must report work that has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. For papers that have been published preliminarily online, please refer to the Society's Preprint policy.

3.1.2 Authorship

All authors must have agreed to the submission and to the order of their names on the title page, and will be asked to confirm this at submission. They must also have agreed that the corresponding author may act on their behalf throughout the editorial review and publication process. Requests for changes in authorship after submission, e.g. to order of the authors or deletion or addition of authors, must be approved by all authors in a signed agreement. Individuals who have contributed to the work but do not meet authorship criteria should be noted in the Acknowledgments section of the manuscript.

3.1.3 Plagiarism

The Society takes plagiarism very seriously and has plagiarism detection software (iThenticate) integrated into our manuscript system. If plagiarism is identified, the COPE guidelines on plagiarism will be followed.

3.2 Permissions

If a table or figure has been published before, the authors must obtain written permission to reproduce the material in both print and electronic formats from the copyright owner. The original source should be cited in the figure caption or table footnote.

[Back to contents list](#)

4. How to prepare your article

4.1 Preparing files for submission

Articles can be submitted initially either as a single PDF file or as a separate Word file with accompanying figure files, which will be compiled into a single PDF by the submission system. However, authors are advised, where possible, to upload files individually to ensure that Editors and Reviewers can access the high-resolution figure files.

Supplementary material should be submitted as a combined PDF separate file, and this will be incorporated into the system-generated PDF.

For information on submitting a revised article, please click [here](#).

4.1.1 Submission as a single PDF

The submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB.

4.1.2 Submission as a separate Word and/or figure files

Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. Excel files are, however, acceptable for supplementary material. Word-processor files including inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate figure files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the paper PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible.

4.1.3 Cover letter

Journal of Medical Microbiology and *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) both require cover letters. For all other journals it is preferable but not mandatory. Please use the following as an indication as to what you should include:

1. *What is the current knowledge of the subject?*
2. *What are the new findings being reported here?*
3. *What impact will your findings have on scientific/clinical practice or policy in the foreseeable future*
4. *Any citations of personal communications or unpublished results should be confirmed in the cover letter*

For further information for the IJSEM cover letter requirements, please see the [IJSEM pre-submission checklist](#).

4.1.4 Nomenclature, style and units

For uniformity of our published research it is important for submissions to adhere to our agreed nomenclature guidelines. Details on nomenclature, style and units to use in your submitted article are available [here](#).

Articles that do not meet these set requirements may encounter problems during peer review and will need to be amended before publication.

4.2 Data depositories

For articles containing new sequence data, the sequence(s) will need to be available through a database upon publication. Authors must include on the title page, the footnote 'The GenBank/ EMBL/ DDBJ/ PIR] accession number for the XXXXXX sequence of XXXXX is XX00000. If the sequence(s) is not yet available, the database flat file (GenBank *.gbk; or, EMBL *.embl) or the NCBI Sequin file (*.sqn) should be made available for review. These files will not be published, but they are essential for reviewing the paper.

All journals welcome the deposition of supporting data.

Microbial Genomics has a mandatory open data policy. Authors are required to provide access to all supporting data, which have either led to the conclusions drawn in their paper, or to allow the procedure described in the paper to be repeated. When submitting to *Microbial Genomics* authors are also required to provide a Data Bibliography

Microbial Genomics has partnered with [Microreact](#), a free data visualisation and sharing platform that allows scientists and health professionals worldwide to better collaborate to understand disease outbreaks. The journal is encouraging authors to upload their data files to Microreact, which can then provide interactive querying of the data via trees, maps, timelines and tables, and published in *Microbial Genomics* via a permanent web link.

Microreact has been developed in the David Aanensen Research Group at Imperial College London and The Centre for Genomic Pathogen Surveillance. It is a [React.js application](#) taking full advantage of the [PhyloCanvas API](#) (trees), the [Google Maps API](#) (maps) and [vis.js](#) library (timeline).

4.3 Pre-submission language editing

Prior to submitting your article, authors may wish to have it edited for correct use of English, particularly if English is not your first language. This step is not compulsory but it may assist the editorial staff, Editors and reviewers to fully understand the content of your article. However, language editing does not guarantee that your article will be sent out for peer

review or accepted for publication. For the *Journal of Medical Microbiology*, articles with poor use of English will be rejected and authors invited to resubmit only once the language has been improved. Authors are advised to ensure the correct use of English in their articles before submitting to the journal.

A large number of language-editing services are available. While you may use any professional scientific editing service of your choice, the Microbiology Society has partnered with Editage to provide publication-focused editing services to Society authors at a 15% discount. If the editorial team finds any language issues in text that Editage has edited, then Editage will re-edit the text for free. To take advantage of this offer click [here](#). If you're an existing Editage customer, you may get the discount by using the code MICSOC10 while making a submission.

[Back to contents list](#)

5. Pre-submission checklists

This information is intended to aid authors prior to submitting their article to the Editorial Manager submission system, in order to avoid delays upon submission and ensure that the article can be assigned to an Editor as quickly as possible.

Please find below journal pre-submission checklists:

- *Microbiology*
- *Journal of General Virology*
- *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*
- *Microbial Genomics* requires authors to adhere to article templates. Click [here](#) for *Microbial Genomics* article templates.
- *JMM Case Reports* requires authors to adhere to article templates. Click [here](#) for *JMM Case Reports* article templates.

For all journals, authors must also include in their paper:

1. Permission for reuse of published content not published by the authors must be uploaded during initial submission. We accept emails, letters and RightsLink confirmation that must be from the copyright holder. Any citations of personal communications or unpublished results must be confirmed in a cover letter
2. A title page
3. Ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style, e.g. standard Vancouver reference style
4. Use continuous line numbering throughout the paper in order to facilitate online reviewing

Via the Editorial Manager submission system, authors must:

1. Agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process. Authors are asked to confirm their co-authorship once the paper has been submitted to the relevant Editorial Manager site
2. Recommend one Editor from the Editorial Board who would be suitable to act as Handling Editor

3. Suggest at least three potential reviewers (with institutional email addresses only) to peer review their article
4. Indicate the word count of the main text (including in-text citations and any appendices, but not including the title page, figure and table legends, acknowledgements, table bodies and footnotes, or reference list)
5. Upload any supplementary material associated with the article as a supplementary file(s) and refer to the supplementary material within their article. Please note for *Microbial Genomics*, it is preferred that supplementary material are deposited to external repositories, unless they are text-only files. Please review the journal's [open data policy](#) for further information.
6. Upload any figures associated with the article as figure files and refer to the figures within their article. Figure legends should be included the end of the article and not in the figure
7. Upload any cited articles that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s)
8. Upload a cover letter (if requested by the journal)
9. Specify, if any, the funding received for the paper

[Back to contents list](#)

6. How to submit a standard research article

For standard research articles, please follow the section order given below. Note that for *Journal of General Virology* only, Methods should follow Discussion.

For guidance on style and layout of articles submitted to *Microbial Genomics*, please refer to the relevant submission templates on the journal's [submission requirements page](#).

For guidance on style and layout of articles submitted to *JMM Case Reports*, please refer to the relevant [submission templates](#).

6.1 Title page (All articles)

6.1.1 Title

- The title of the article; this should provide a concise statement of the contents of the article. A good title is very important as it will attract readers and facilitate retrieval by online searches, thereby helping to maximise citations. The title should include topical keywords and allude to the interesting conclusions of the article. A title that emphasises the main conclusions, or poses a question, has more impact than one that just describes the nature of the study.

6.1.2 Authors and affiliations

- Author names should be given in upper- and lower-case, not in all capitals, to avoid ambiguities such as 'van' and 'Van'. The author for correspondence must be clearly indicated. It is permissible to include the names of more than one author as corresponding author, but a single author must act as the point of communication during the peer review process.
- The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.

6.1.3 Corresponding author details

- An email address and telephone number for the corresponding author.

6.1.4 Keywords

- Select keywords that will make your article easily searchable.

6.1.5 Subject category

- Each submitted article should be assigned a subject category through the Editorial Manager submission system, in addition to an article type. This enhances discoverability and allows filtering of published content on the website.
- Subject categories are limited for scope, are journal-specific, and are particularly important for submissions to IJSEM. For a list of available categories per journal please visit the 'About' page for the relevant publication here:

Microbiology

Journal of General Virology

Journal of Medical Microbiology

JMM Case Reports

Microbial Genomics

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

6.1.6 Word count

- The word count of the article is made up of the abstract and main text, excluding table and figure legends and references

6.1.7 Depositories (where applicable).

- When reporting new sequence data, the accession number must be given, e.g. 'The GenBank[/EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/gyrA, etc.] sequence of XXXXX is XX00000'.

6.1.8 Abbreviations (where applicable)

- A footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition can be found [here](#).

6.2 Abstract

This section is likely to be read by more people than the full article, and many abstracting services use authors' summaries without modification. It is therefore important that this section is clear and comprehensible in its own right. The abstract should, if possible, introduce the subject in the first sentence and present the main conclusion in the last sentence. References should not be cited, and any non-standard abbreviations used must be

defined. Abstracts are unstructured for all journals, except *JMM Case Reports* and *Journal of Medical Microbiology*.

6.3 Introduction

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

6.4 Methods

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. If the name of suppliers or equipment changes between your work and submission, please ensure this is clearly indicated. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason.

6.5 Results

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organised, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

6.6 Discussion

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

6.7 Author statements

The following author declaration statements must be included at the end of the article in the order of Funding information, Acknowledgments, Conflicts of interest and Ethical statement. The sections below provide information of regarding what is required for each author statement.

6.7.1 Funding information

Authors should describe the sources of funding that supported this work and ensure that this information is detailed and accurate. Authors must state the names of funding bodies and grant numbers. Authors associated with specific funding sources should be named. Authors must also state whether any persons employed by the funders (other than the authors) played any role in the study or in the preparation of the article or decision to publish. These persons need to be named and their role must be described. If no funding was received, please state that this work received no specific grant from any funding agency.

6.7.2 Acknowledgements

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. Authors may also wish to acknowledge individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies. Please do not refer to the Editor who handled your submission in this section.

If materials and results were obtained from outside the authors' laboratories (e.g. production of antibodies, properties of strains), this must be explicitly stated, and an acknowledgement must be included where appropriate.

6.7.3 Conflicts of interest

Authors must declare any potential conflicts of interest in the manuscript. A conflict of interest may exist when your interpretation of the results or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organisations. If no conflict exists, authors need to declare that there is no conflict of interest.

Examples of potential financial conflicts of interest include:

- Receipt of funding or salary from an organisation that might gain or lose financially from publication of your paper. E.g. *Dr Jones' work has been funded by XXXX; Dr Smith has consulted for XXXX Company and received a salary for this employment.*
- If you hold stocks or shares in such an organisation. E.g. *Dr Brown has received compensation as a member of the scientific advisory board of XXXX and owns shares in the company.*
- If you hold or are applying for a patent relating to the content of this manuscript. Examples of non-financial conflicts of interest might include political, religious or intellectual conflicts.

6.7.4 Ethical statement

Articles describing any experimental work with humans should include a statement that the Ethical Committee of the institution in which the work was done has approved it, and that the subjects gave informed consent to the work. The Editors of the Society's journals will accept papers describing experiments conducted using animals. However, such experiments must be carried out in accordance with the legal requirements of the relevant local or national authority and authors must provide a statement affirming the approval of these experiments by the relevant Ethical Committee. Details of the procedures followed must be provided, and must be such that experimental animals do not suffer unnecessarily. The

Editors will not accept papers in which, in their opinion, the ethical aspects are open to doubt. Authors are encouraged to consult the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals.

6.7.5 Consent for publication

For all articles that include details, images, or videos relating to an individual person, written informed consent for the publication of these details must be obtained from that person, or their parent or legal guardian in the case of children under 18. If the person has died, consent for publication must be obtained from their next of kin. The consent must be for publication of their details such that they will be published in a scholarly journal and made freely available on the internet or in print. The article must include a statement that written informed consent for publication was obtained.

You can use our [consent form](#) to obtain consent for publication, or a consent form from your own institution or region if appropriate. The consent form must state that the details/images/videos will be freely available on the internet or in print and may be seen by the general public. The consent form must be submitted with the article and will be treated confidentially.

In cases where images are entirely unidentifiable and there are no details on individuals reported within the article, consent for publication of images may not be required. The final decision on whether consent to publish is required lies with the Editor.

6.8 Abbreviations

Please include any non-standard abbreviations referred to within your paper. A list of standard abbreviations can be found [here](#).

[Back to contents list](#)

7. References

References in the text should be cited using the Vancouver referencing system (citation-sequence reference system).

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. All listed references must be cited in the text. In the text, cite the reference number in square brackets, e.g. Studies have shown that RegB/RegA controls many energy generating and energy utilising systems such as photosynthesis [1].

Author names must be in bold. Abbreviate journal names according to MEDLINE and journal titles should be properly abbreviated and italicized. Page numbers should not be truncated.

For users of the referencing manager Endnote, you can download our reference styles here:

- *Microbiology*
- *Journal of General Virology*
- *Journal of Medical Microbiology*
- *JMM Case Reports*

- *Microbial Genomics*
- *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

7.1 Bibliography

For references with five or fewer authors, give the names of all authors in the form 'Surname Initials' and separate each with a comma. For references with more than five authors, list the first five followed by *et al.*

7.2 In-text examples:

7.2.1 Sample journal:

Cerdà-Cuéllar M, Rosselló-Mora RA, Lalucat J, Jofre J, Blanch A. *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:58–61.

Pasta F, Sicard MA. Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synopsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* 1996;142:695–705.

7.2.2 Sample journal reference for more than five authors:

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1996;388:539–547.

7.2.3 Sample reference to a whole book:

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

7.2.4 Sample reference to a book chapter or section:

Romano AH, Saier MH Jr. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In: Mortlock RP (editor). *The Evolution of Metabolic Function*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992. pp. 171–204.

7.2.5 References to websites

Essential items that must be provided are:

- an author(s) (which may be a company name or organisation).
- a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated).
- the URL (web address) of the page;
- a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes).

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

7.3 Bibliography style points:

- Only articles accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list and the reference must include the name of the journal. Relevant articles cited as 'in press' should be included as supplementary material with the online submission.

References to articles not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such articles should not appear in the list of references.

- Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results. Permission from the copyright holder must be included at initial submission.

[Back to contents list](#)

8. Tables

These should be broadly comprehensible without reference to the text, but it is not necessary to repeat detailed descriptions of methods, etc. The symbols [markup] * † ‡ § || # should be used for footnotes, rather than superscript letters or numbers. When results are expressed as percentages, the absolute value(s) corresponding to 100% must be stated. Statements of reproducibility should be included (see above). Tables should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text.

[Back to contents list](#)

9. Figures

9.1 Permissions

If using figures or tables that have been previously published elsewhere, it is the responsibility of the authors to obtain permission from the original copyright holder prior to submission. Permission must be included at initial submission.

9.2 Colour figures

For *Microbiology*, *Journal of General Virology*, *Journal of Medical Microbiology*, and *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, figures are published in colour free of charge in print if the use of colour is judged to be necessary for scientific reasons. There are no charges for supplementary material.

There are no colour charges for publishing in *JMM Case Reports* and *Microbial Genomics* as they are online-only journals.

9.3 Format

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching. Where possible, please also supply

line drawings, bar diagrams and sequence data in the original file format in which they were generated and/or as EPS (Encapsulated PostScript), PowerPoint or CorelDraw files. Do not supply as PostScript files as these cannot be used.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) **not** Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) **not** (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., **not** (A), (B), etc.

All figure files should not include a figure legend. The figure legends should be included in the Word document of the main text file.

9.3.1 Line drawings.

These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

9.3.2 Bar diagrams.

Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 3-D bars unless there is a specific justification for their use.

9.3.3 Sequence data.

Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5-2 mm (or 6-8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80-100 nucleotides per line is appropriate (or 60-70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50-60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

The Microbiology Society does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary material.

9.3.4 Photographs (halftones).

The preferred format for halftones (i.e. photographic images) is TIFF, but PDF, EPS and JPG/JPEG are also accepted. If image files are pasted into Word, PowerPoint, Photoshop etc., in order to add lettering or other annotation or to combine line and halftone images, the original unlabelled halftone images should also be supplied. A final print resolution of 300 d.p.i. or more is recommended. Colour images should use CMYK colour (which can be reproduced in print) rather than RGB (which cannot be reproduced faithfully using four-colour printing) (this setting can be accessed in Adobe Photoshop via Image:Mode:CMYK

Color, for example). For some colour images, such as fluorescence micrographs, it may be useful to submit an RGB version of the image to be mounted online as supplementary material. For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

9.3.5 Matrices and trees.

Similarity or distance matrices should not be presented unless specific features of the entire table are discussed. However, representative similarity values should be presented in the text. In taxonomic papers, trees should only be included for showing the importance of a phylogenetic analysis to a taxonomic description; the size of trees should be reduced - only nearest neighbours should be included, but the authors should, in the legend or Methods, list the other taxa (including strain and sequence accession numbers) used to generate the tree. Strain names should be those provided by the original depositor of the sequence.

Trees must include the names of organisms, their strain name or number (as stated by the depositor of the sequence, with type strains indicated where appropriate by a superscript capital T) and sequence accession number (space permitting). The size and style of font and width of lines should be such that the figure can be reduced as much as possible, in order make economical use of space in the journal. It is important to ensure the accuracy of names (check them in the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature when making the final revision of the paper) and accession numbers in trees, as correction is time-consuming and expensive and may lead to the introduction of further errors.

Microreact has been developed in the David Aanensen Research Group at Imperial College London and The Centre for Genomic Pathogen Surveillance. It is a React.js application taking full advantage of the PhyloCanvas API (trees), the Google Maps API (maps) and vis.js library (timeline). *Microbial Genomics* has partnered with Microreact, a free data visualisation and sharing platform that allows scientists and health professionals worldwide to better collaborate to understand disease outbreaks. The journal is encouraging authors to upload their data files to Microreact, which can then provide interactive querying of the data via trees, maps, timelines and tables, and published in *Microbial Genomics* via a permanent web link.

[Back to contents list](#)

10. Supplementary Material

Supplementary material is associated material that does not directly pertain to the main research findings. It is material that is relevant to the article and is not only data but could be Methods etc. This should be included at initial submission for review purposes and will be published alongside the article's version of record.

Supporting data refers to *Microbial Genomics* only. It refers to data that needs to be deposited in Figshare or the author's chosen data repository; this is a submission requirement and authors should obtain a data doi and cite this in the published article.

10.1 All journals

All of our journals welcome the submission of supplementary material. Material associated with an article but not suitable for publication as part of the article (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures or movie files) can be included as online-only supplementary material. Data that are essential for interpretation of the results of the main article should be included in the main article. All supplementary material files will be reviewed along with the main article; these will not be published unless they significantly enhance the article. The Editors may suggest that figures or tables included within a paper should be converted into supplementary material.

Supplementary material must not include methods for results that are included in the main article, nor should they introduce different results or new discussion points.

All supplementary material is made freely available upon publication of the final version of the article.

10.2 *Microbial Genomics*

Microbial Genomics has a mandatory [open data policy](#) that requires authors to submit supporting data, protocols, and/or bioinformatics programmes and software to relevant depositories.

Authors are encouraged to submit supporting data such as large datasets, sequence alignments, 3D structures or movie files, to relevant subject-specific or general depositories. Large supplementary figures or tables these can be transferred to the Journal's [figshare portal](#) via the Editorial Office once your paper has been submitted. Text-based supplementary material more suited to PDF publication, may be submitted with your article. This will be published alongside the main paper exactly as supplied by the author.

10.3 *JMM Case Reports* translated abstracts

JMM Case Reports authors can now publish a translated version of their article's abstract in their native language. The native language abstract is free to publish and authors can choose to write the abstract in the language of their choice. However, only a single translated abstract may be published per article.

To submit a translated abstract, authors need to complete the [Translated Abstract template](#) and submit it as part of their revised submission. Please note that the translated abstract will not be peer reviewed or typeset and authors need to ensure their accuracy. The translated abstract will be published as supplementary material and will only appear with the final version of the published article.

10.4 Submission

- Supplementary material should be uploaded at the time of submission; please upload as file type Supplementary Material on the Editorial Manager submission system.
- Supply all supplementary material in the file formats given below.
- Very large files or those requiring specialist software are not suitable as they will be difficult for the reader to download or view.

10.5 Presentation

- Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and must be cited accordingly in the main paper. Figure and table legends should also be present in the main paper.
- Provide a heading and, if appropriate, a short text description with each supplementary material item.

10.6 File types

- Material should be submitted in PDF format; Please note that .doc(x) or .ppt(x) files are not suitable.
- Multiple figures, tables or text items should be supplied as a single PDF.
- Large datasets can be supplied in Excel format if you wish readers to be able to manipulate the data. If not, please convert to PDF or upload to the Journal's [figshare portal](#) via the Editorial Office once your paper has been submitted.
- Audio, video and animations can be supplied as .mov, .avi or .mpeg files.

10.7 Processing of supplementary material

- Supplementary material will be published alongside the main article exactly as supplied by the author. They do not undergo typesetting or copyediting. It is the authors' responsibility to ensure that all files are presented clearly.

[Back to contents list](#)

11. How to submit a revised article

Revised articles should be submitted by the date indicated in the decision letter. If more time is required, the author should contact the Editorial Office or Editor to discuss a new deadline. If the revision is delayed by the author without prior agreement, the revised manuscript may be treated as a resubmission.

11.1 Revision checklist

As well as following the standard [pre-submission checklist](#), authors are also asked to include the below when submitting a revised manuscript:

11.1.1 *Rebuttal letter*

- If the paper was peer reviewed, authors must provide a detailed rebuttal letter, detailing their response to each point raised by the reviewers.

11.1.2 *Main text file*

- Please upload a Word document, containing references, table and figure legends, and tables. Please do not include any highlighted text. Microsoft Word files are preferred; .docx files

produced in Word 2007 or 2010 can be used as source files. TeX and LaTeX formats can not be used.

- Authors may upload a highlighted marked-up version of their revised article as a supplementary file in order to aid the Editors and reviewers. This is mandatory in *Journal of General Virology*.

11.1.3 Tables

- Tables must not be supplied as image files (TIFF, PDF, PowerPoint); files containing tables prepared as images (whether provided separately or pasted into a Word file) will be returned to the author and this may delay publication. Tables should be prepared using your software's table functions, with individual entries in individual table cells.
- Tables must not be supplied as tab- or space-separated text or as multiple entries separated by line breaks in single table cells.
- Tables prepared in Microsoft Excel can be accepted but are not desirable.
- Tables must be in an editable format.

11.1.4 Line figures

- Line figures should be produced as vector rather than bitmap (raster) images. Acceptable formats are PDF, EPS, CorelDRAW (.cdr; version 15 or earlier), Adobe Illustrator (.ai), Microsoft Excel (.xls), Microsoft Word and Microsoft PowerPoint. Fonts must be embedded for figures supplied as PDF or EPS. TIFF and other bitmap formats are not recommended for line figures; if their use cannot be avoided, the resolution should be at least 600 d.p.i.
- Charts prepared in Microsoft Excel should be supplied in Excel format where possible. If they are copied and pasted into another Microsoft application, use Paste Special and select 'Picture (Enhanced Metafile)'.

11.1.5 Halftone figures (photographs)

- Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approximately 1000 pixels wide for a single-column figure and 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

11.1.6 Scanning images

- If images must be scanned, a resolution of 300 d.p.i. is usually sufficient for same-size reproduction of halftone (photographic) images without text, whereas 600 or 1200 d.p.i. should be used for figures containing lines and/or text. The scanned image should be cropped to remove as much white space as possible and supplied in TIFF format.

11.1.7 Equations

- Equations that cannot be represented using the keyboard can be prepared using the Word equation editor (in versions up to Word 2003) or MathType. Word 2007/2010 users should not use the default equation editor to prepare equations as it is not compatible with any other current software; equations in Word 2007/2010 should be prepared using the MathType equation editor or the 'legacy' equation editor included as part of Word (i.e. a Microsoft Equation 3.0 object, accessible from 'Insert Object' on the 'Insert' ribbon).

11.1.8 Supplementary material

- A combined PDF of all supplementary material.

[Back to contents list](#)

12. Author forms

For *Microbiology*, *Journal of General Virology*, *Journal of Medical Microbiology*, and *JMM Case Reports* a licence to publish form must be completed by authors. This means the copyright does not transfer to the publisher but should instead be categorised under one of the three following options:

Copyright Type A: This is to be used when the article is already in the public domain. One or more of the authors are employees of the US Federal government and they are acting in the course of their employment. Copyright is not assigned to anybody and thus nothing is noted on the article.

Copyright Type B: this is to be used when copyright is to be retained by the employer. One or more of the authors are employees of the copyright holder and acting in the course of their employment. It is displayed with an editable statement provided by the author/their company. (E.g. for UK government employees a '© 2015 Crown Copyright' statement is used)

Copyright Type C: This is the standard copyright to be used when copyright belongs to the author. It will be displayed in the articles as: '©The Authors'.

For *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* a separate copyright form must be completed in all cases and the copyright is transferred to the IJSEM. The IJSEM copyright assignment form can be found [here](#).

For *Microbial Genomics* we offer both the CC-BY 4.0 license to publish form and also the CC-BY-NC 4.0. The CC-BY OpenMicrobiology licence to publish form can be found [here](#). The CC-BY-NC license to publish form can be found [here](#).

Authors are unable to complete the submission of their revised article until the relevant forms have been uploaded. All forms can be found [here](#).

12.1 Licence to Publish form/Copyright form

All revised papers must be accompanied by a signed Licence to Publish or Copyright form. Please visit the [Editorial policies page](#) for information on the specific form required for your paper.

12.2 Change of Authorship form

If the order of authors has changed since submission, or if any authors have been removed or added, all authors will need to sign a Change of Authorship form, which must be uploaded with the revised article.

[Back to contents list](#)

13. Post-acceptance

13.1 Continuous publication

Articles are published online in their final form (i.e. the typeset, copyedited, proofed and corrected copy) in the 'Latest Articles' section of the website in an 'open' issue. Once a month these issues will be 'closed' and moved to the 'Current Issue' section of the website and contain the final Version of Record of each article with pagination.

For further information on post-acceptance articles, please see our [Post-print policy](#).

13.2 Proof corrections

Proofs are checked using our online author proofing system. A link to the proof of your article is sent to the email address supplied for the corresponding author. It is the authors' responsibility to inform the Editorial Office of any changes to this email address.

Only typographical and absolutely essential factual changes may be made at this stage.

13.3 Reprints

After publication authors can order reprints of their articles. For articles published on and before July 2015, please go to the [CPrint+ platform](#). For articles published after this date, please contact journalsales@microbiologysociety.org.

Commercial reprints must be ordered directly through the Society. Please email our Journal Sales team.

For information on our reprints policy, please click [here](#).

[Back to contents list](#)

ANEXO B – Normas do periódico Journal of Applied Oral Science

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Sending of manuscripts](#)

Scope and policy

1 SCOPE

The **Journal of Applied Oral Science** is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental and speech-language pathology and audiology communities, according to the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original research/clinical investigations in the field of Oral Sciences, with emphasis in dentistry, speech-language pathology and audiology, and related areas.

Submissions of case reports (including case series and clinical protocols) are no longer accepted by The Journal of Applied Oral Science and review manuscripts (including systematic reviews) can only be submitted under the editor's invitation

This Journal adopts Creative Commons license CC-BY:

"This license lets others distribute, remix, tweak, and build upon your work, even commercially, as long as they credit you for the original creation. This is the most accommodating of licenses offered. Recommended for maximum dissemination and use of licensed materials."

1.1 Publication fee

There is no fee to authors for submitting to the JAOS nor Article Processing Charge (APC).

2 General Guidelines

2.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

2.2 Only papers written in the English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts, citations and references.

2.3 The Journal of Applied Oral Science has the right to submit all manuscripts to the Editorial Board, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.4 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.5 The dates of receipt of the original paper and its acceptance will be indicated in the occasion it is published.

2.6 The Journal of Applied Oral Science is published exclusively in electronic format.

3 Revision Criteria

3.1 Pre-evaluation: manuscripts in accordance with the instructions will be appreciated by Associate Editors regarding its adequacy to Journal scope and the presentation of all required documents. Papers considered inadequate will be rejected and returned to authors.

3.2 Technical review: manuscripts will be firstly evaluated regarding presentation according to the instructions for authors and presence of mandatory documents required for submission. Manuscripts not in accordance with instructions will be returned to authors for adjustments before being reviewed by Associate Editors and referees.

3.3 Merit and content evaluation: papers approved by Associate Editors will be evaluated in their scientific merit and methods by at least two *ad hoc* referees from different institutions of that of the authors, besides the Editor-in-Chief.

3.3.1 As part of the evaluation process, all manuscripts will be submitted to analysis by a plagiarism software.

3.3.2 Editor-in-Chief will decide on manuscript acceptance. When revision of the original is required, the manuscript will be returned to the corresponding author for modification. A revised version with modifications will be re-submitted by the authors, and that will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board, if necessary.

3.4 After approval of the scientific merit, manuscripts will pass through a final review performed by a professional assigned by the JAOS. If manuscripts are still considered inadequate, they will be returned to authors for revision.

3.5 Authors and referees will be kept anonymous during the review process.

3.6 Contents of the manuscript are the authors' responsibility and do not reflect the opinion of the Editor-in-Chief or Editorial Board.

4 Galley Proofs

4.1 Galley proofs will be sent to the corresponding author by electronic mail in pdf format for final approval.

4.2 Approval of galley proofs by the corresponding author should be returned with corrections, if necessary, within 48 hours.

4.3 Corrections in the galley proofs should be restricted to minor mistakes that do not modify the content of the manuscript. Major corrections will imply that the manuscript should enter the review process again.

4.4 If there is no return of proof in 48 hours, the Editor-in-Chief will consider the version without changes as the final version.

4.5 Inclusion of new authors is not allowed at this phase of the publication process.

4.6 It is the sole responsibility of the authors to verify the proper use of their scientific names in the manuscript.

Form and preparation of manuscripts

1 Presentation of the Manuscript

1.1 Structure of the manuscript

1.1.1 Cover page must be submitted as a supplementary file and should contain only:

- Title of the manuscript in English.
- Names of the authors in direct order with their respective affiliations in English. Affiliations must be written in Portuguese for Brazilian authors, in Spanish for Spanish authors, and in English for the other nationalities.
- Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including phone number as well as e-mail address.

1.1.2 Text

- The paper must be previously translated or reviewed by professional or company responsible for English

language. Authors with English as native language must submit as supplementary file a signed letter taking responsibility for the quality of the English language and editing of the text.

- Title of the manuscript in English.
- Abstract structured in a sole paragraph: should comprise at most 300 words, highlighting a little introduction, objective, material and methods, results and conclusions.
- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the MeSH and DeCS. Authors must use periods to separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.
- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- Material and Methods: the material and the methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed, if applicable. Please refer to item 3 for ethical principals and registration of clinical trials.
- Results: presents the outcomes in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in the text, and only important findings should be highlighted.
- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings as well as their limitations.
- Conclusion(s) (if any).
- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants, scholarships and fellowships with respective names and identification numbers.
- References (please refer to item 2.3)

2 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc).

2.1 Illustrations and Tables

2.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numbers according to the order they appear in the text.

2.1.2 Photographs should be sent in .jpg or tif formats with at least 10 cm width and at least 300 dpi. These illustrations should be provided in supplementary files and not inserted in the Word document.

2.1.3 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numbers. The legend shall be placed on the top of the tables. Tables should be open in the right and left laterals.

2.1.4 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a separate list preceded by the corresponding number.

2.1.5 Footnotes should be indicated by asterisks and restricted to the least amount possible.

2.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: " and interfere with the bacterial system and tissue system. "^{3,4,7-10} References must be cited in a numeric ascending order within the paragraph.
2) or alphanumeric

- one author - Gatewood³¹ (2012)
- two authors - Cotti and Mercurio¹⁹ (2016)
- three authors - Azar, Safi, Nikaein²⁷ (2012)
- more than three authors - Gealh, et al.²⁸ (2014)
- Punctuation characters such as periods and commas must be placed after the numeric citation of the authors. Ex: Ferreira³⁸ (2015).

2.3 References

The references must follow the "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver" available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

2.3.1 All references must be cited in the text. They should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow MEDLINE.

2.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date must not be included in the reference list.

2.3.3 Abstracts, monographs, dissertations and theses will not be accepted as references.

2.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex: Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, et al.

2.3.5 At most 40 references may be cited.

Examples of references:

Book

Preedy VR, organizer. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015.

Book chapter

Buzalaf CP, Leite AL, Buzalaf MA. Fluoride metabolism. In: Preedy VR, organizer. Fluorine: chemistry, analysis, function and effects. London: Royal Society of Chemistry; 2015. p. 54-72.

Papers published in journals

Gorduysus M, Nagas E, Torun OY, Gorduysus O. A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal. Aust Endod J. 2011;37(3):128-33.

Online-only journal article (with electronic identifier)

Rudolph H, Ostertag S, Ostertag M, Walter MH, Luthardt RG, Kuhn K. Reliability of light microscopy and a computer-assisted replica measurement technique for evaluating the fit of dental copings. J Appl Oral Sci [Internet]. 2018[cited 2017 Dec 12];26:e20160590. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0590>

Journal article with DOI

Wagner F, Strasz M, Traxler H, Schicho K, Seemann R. Evaluation of an experimental oblique plate for osteosynthesis of mandibular condyle fractures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017;124(6):537-41. doi: 10.1016/j.oooo.2017.09.004

Journal article Epub ahead of print/In press/Forthcoming

Nair R, Chiu SE, Chua YK, Dhillon IK, Li J, Yee RT. Should short-term use of alcohol containing mouthrinse be avoided for fear of worsening xerostomia? J Oral Rehabil. Forthcoming 2017. doi: 10.1111/joor.12587

Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al."

Grubbs V, Plantinga LC, Crews DC, Bibbins-Domingo K, Saran R, Heung M, et al. Vulnerable populations and the association between periodontal and chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:711-7

Volume with supplement and/or Special Issue

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2006;14(sp. Issue):3-9.

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

3 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS

3.1 Experimental procedures in humans and animals

The Journal of Applied Oral Science reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval.

3.1.1 Papers presenting **clinical trials** or **clinical studies in human volunteers or in animals** must contain the Ethical Committee approval of the reports **as mandatory supplementary file**.

3.1.2 Papers describing studies in animals must be submitted with the ARRIVE Checklist as mandatory supplementary file. The ARRIVE Checklist is available at

<https://mc04.manuscriptcentral.com/societyimages/jaos-scielo/ARRIVEChecklist.docx>

3.1.3 Ethics Committee certificate written in different languages from English, Spanish and Portuguese must be full translated into English.

3.2 Clinical Trial Registration

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioral treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

3.2.1 Manuscripts presenting clinical trials in human volunteers must be submitted with the following mandatory supplementary files:

- CONSORT 2010 checklist (<http://www.consort-statement.org/>);
- registration number of the research in a database that meets the requirements of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)
- Suggestions: for Brazilian authors: <http://www.ensaiosclnicos.gov.br/>
- Suggestions for Brazilian and non-Brazilian authors: <http://www.controlled-trials.com/> (ISRCTN) or <http://prsinfo.clinicaltrials.gov>.

3.3 The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

4 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE Editor-in-Chief AND EDITORIAL BOARD

Sending of manuscripts

1 MANUSCRIPT SUBMISSION

1.1 Articles must be submitted through the following address <https://mc04.manuscriptcentral.com/jaos-scielo>

1.2 The original file containing the main manuscript must be submitted without the authors' identification and affiliations. The cover page must be submitted as a supplementary file containing the names of the authors, affiliations and correspondence address.

1.3 Figures must be submitted as supplementary files according to the specifications of item 2.1 regarding the form and preparation of manuscripts.

1.4 - Tables must be prepared in Excel format and must be submitted as a supplementary files.

1.5 Files such as registration number of clinical trial or Ethics Committee approval must be sent as mandatory supplementary files.

1.6 The letter from the author responsible for English language or from a professional or company responsible for translation or review must be submitted as mandatory supplementary file.

1.7 The submission form, signed by ALL the authors, must be submitted as a supplementary file.

1.8 The Journal of Applied Oral Science recommends the inclusion of the ORCID registration number of the authors for manuscript submission. All authors must associate the ORCID registration number to their profile on ScholarOne.