



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

BRUNA PALMEIRA COSTA

**EFEITO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE *Sideroxylon obtusifolium* T. D.
Penn SOBRE O BIOFILME DE ESPÉCIES DE *Candida*.**

**CAMPINA GRANDE/PB
2020**

BRUNA PALMEIRA COSTA

**EFEITO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE *Sideroxylon obtusifolium* T. D.
Penn SOBRE O BIOFILME DE ESPÉCIES DE *Candida*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Otimização de produtos relacionados ao tratamento de agravos à saúde bucal

Orientadora: Profa. Dra. JOZINETE VIEIRA PEREIRA MARQUES

**CAMPINA GRANDE/PB
2020**

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.

C837e Costa, Bruna Palmeira.
Efeito da fração diclorometano de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn sobre o biofilme de espécies de *Candida* [manuscrito] / Bruna Palmeira Costa. - 2020.
91 p. : il. colorido.
Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.
"Orientação : Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques, Departamento de Odontologia - CCBS."
1. *Sideroxylon*. 2. Atividade antifúngica. 3. Candidíase oral.
4. Biofilme. I. Título

21. ed. CDD 615.321

BRUNA PALMEIRA COSTA

**EFEITO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE *Sideroxylon obtusifolium* T. D.
Penn SOBRE O BIOFILME DE ESPÉCIES DE *Candida*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica.

Aprovada em 10/08/2020

BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa
Examinador externo – Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Examinador externo – Universidade Federal da Paraíba



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



Prof. Dr. Harley da Silva Alves
Examinador interno – Universidade Estadual da Paraíba

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Julio Cesar da Silva Costa e Maria de Fátima Palmeira Costa, pelo amor, pela educação, pela força e por ter me ensinado a lutar pelos meus sonhos e a acreditar na superação dos obstáculos.

À minha querida avó, Mercês Palmeira, pelo carinho, ternura e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ter me dado a oportunidade de poder realizar mais um sonho dentre tantos outros que ainda terei. Por ter me dado saúde e proporcionado momentos inesquecíveis enquanto doutoranda.

Aos meus pais, avó, irmãos e cunhada, pela torcida, pelo apoio incondicional, por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis, por acreditarem nos meus sonhos e irem à luta comigo e principalmente por ter me ajudado a ser a pessoa que sou hoje. Essa vitória é para vocês.

Aos meus tios, primos e amigos, que juntos fazem de nós uma grande família, pelas palavras motivadoras, pela mão estendida e presença constante na minha vida.

À minha orientadora Jozinete Vieira, por ter sido dedicada e me ajudado a concluir essa pesquisa. Por ter se tornado mais que uma professora e sim uma amiga. Agradeço pela sua paciência, pelo carinho, pela preocupação e por ter me passado ensinamentos que não esquecerei jamais.

Aos meus companheiros de equipe, o TIME JOZI! Pela parceria, pelos sorrisos, pela disposição sempre em ajudar, por ter me proporcionado momentos que ficarão guardados eternamente no meu coração. Que bom ter conhecido vocês!

Às minhas amigas de turma que conviveram comigo nesses quatro anos na Universidade Estadual da Paraíba, principalmente à Ana Luzia, pela acolhida, pelos conselhos e pela palavra certa no momento certo. Que esse seja o início de uma bela e bem-sucedida jornada de desafios e de sonhos para nós todas.

Aos coordenadores Cassiano Francisco Weege Nonaka e Daniela Pita de Melo e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Em especial, às Profs. Edja Maria Melo de Brito Costa e Pollianna Muniz Alves pela ajuda na realização das análises microbiológicas no Laboratório de Análises e Diagnóstico e no Laboratório de Patologia do Departamento de Odontologia da UEPB.

Aos professores Harley da Silva Alves e Vicente Carlos de Oliveira Costa por ter colaborado com seus ensinamentos nas análises fitoquímicas e estarem dispostos a ajudar na realização desse projeto.

Às amigas Carolina Medeiros e Priscilla Guimarães, pela amizade, carinho e pelos treinamentos durante os experimentos de Microbiologia.

Aos alunos de Pós-Graduação do curso de Farmácia, George, Layla e Geovana, pelo grande apoio recebido e por toda instrução durante as análises fitoquímicas.

À Universidade Estadual da Paraíba por fazer parte da minha história. Pelo suporte técnico e estrutural; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, a todos os técnicos e funcionários dos Programas de Pós-Graduação dos cursos de Odontologia e Farmácia por terem caminhado junto comigo nesses quatro inesquecíveis anos de muito trabalho, muita luta, mas também, de muitas conquistas e muitos momentos prazerosos.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar. ”

(Anatole France)

RESUMO

Pesquisadores têm trabalhado cada vez mais na busca de substâncias que possuam atividade antifúngica e possam ser utilizadas no tratamento da Candidose oral. A planta *Sideroxylon obtusifolium* (*S. obtusifolium*) é um vegetal encontrado principalmente na região da caatinga do nordeste brasileiro e tem sido popularmente utilizada no tratamento de diversas afecções. Sua atividade antimicrobiana já foi descrita na literatura, porém de forma escassa. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil fitoquímico da fração diclorometano (FDIC) proveniente do extrato hidroetanólico de folhas de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn bem como avaliar atividade antifúngica e antibiofilme sobre espécies do gênero *Candida* spp. Após a produção do extrato e posterior fracionamento, foi realizada a análise do perfil fitoquímico por meio de *screening* qualitativo, quantitativo e de ressonância magnética nuclear de ^1H para a FDIC. Em seguida, foi investigada a atividade antifúngica da FDIC por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) sobre *Candida albicans* e em espécies não-*albicans*. Após essa etapa, foi analisado o efeito da fração sobre a cinética de crescimento (Curva *Time-Kill*) de *C. albicans* (ATCC 10232) e inibição de aderência e biofilme maduro de *C. albicans* (ATCC 10232), *C. glabrata* (ATCC 90030) e da associação entre as duas leveduras com base no número de unidades formadoras de colônias (UFC) e atividade metabólica. Os dados das análises da ação da FDIC sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* e da eficácia antibiofilme foram analisados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) com um nível de significância de 5%. O teste de variância a um fator fixo (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey foram empregados para checar diferenças nas variáveis dependentes entre os grupos respectivamente. A caracterização fitoquímica sugeriu a presença majoritária de saponinas e compostos fenólicos. A FDIC apresentou valores de CIM entre 250 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ e CFM entre 1000 $\mu\text{g/mL}$ e >1000 $\mu\text{g/mL}$, com atividade fungistática sobre a maioria das espécies fúngicas estudadas. A concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ da fração apresentou atividade fungicida por um período de 24 h sobre *C. albicans*, apresentando maior atividade na redução da aderência e do biofilme dessa espécie fúngica. A fração na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi eficaz na redução da adesão e do biofilme de *C. glabrata* (ATCC 90030), enquanto que no biofilme da associação das duas cepas esse valor caiu para 250 $\mu\text{g/mL}$. A FDIC apresentou atividade antifúngica, sendo fungistática contra a maioria das espécies testadas. Além disso, reduziu a aderência e o biofilme das espécies de *Candida* spp. Diante dos resultados apresentados, há necessidade da realização de mais análises como atividade antioxidante e testes de toxicidade com a FDIC, visando uma possível utilização clínica da fração como terapia antifúngica alternativa na Odontologia.

Descritores: *Sideroxylon*. *Candida*. Candidíase oral. Biofilme.

ABSTRACT

Researchers have been working in the search for substances that have antifungal activity and can be used in the treatment of oral candidiasis. *Sideroxylon obtusifolium* (*S. obtusifolium*) is a plant found mainly in caatinga of Brazilian Northeastern and has been popularly used in the treatment of several conditions. Its antimicrobial activity has been described in the literature, but in a scarce way. The aim of this study was to analyze the phytochemical profile of the dichloromethane fraction (DICF) of the leaves of *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn hydroethanolic extract as well as to evaluate its antifungal and antibiofilm activity on species of the genus *Candida* spp. After the production of the extract and subsequent fractionation, the analysis of the DICF phytochemical profile was carried out through qualitative and quantitative screening beyond ¹H nuclear magnetic resonance. Then, the antifungal activity of the DICF was investigated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) on *Candida albicans* and non-*albicans* species. After that, it was analyzed the effect of the fraction on the growth kinetics (*Time-Kill Curve*) of *C. albicans* (ATCC 10232) and adherence and mature biofilm inhibition of *C. albicans* (ATCC 10232), *C. glabrata* (ATCC 90030) and the association between the two yeasts based on the number of colony forming units (CFU) and metabolic activity. The data from the analysis of the DICF's action on the growth kinetics of *C. albicans* and the antibiofilm efficacy were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program with a significance level of 5%. The one-way test of variance (one-way ANOVA) and Tukey's post-test were used to check differences in the dependent variables between the groups respectively. Phytochemical characterization suggested the majority of saponins and phenolic compounds. The DICF showed MIC values between 250 µg/mL and 1000 µg/mL and MFC between 1000 µg/mL and > 1000 µg/mL, with fungistatic activity on most of the studied fungal species. The fraction concentration of 2000 µg/mL showed fungicidal activity for a period of 24 h on *C. albicans*, showing greater activity on reducing the adhesion and biofilm of this fungal species. The fraction concentration of 1000 µg/mL was effective on reducing the adhesion and biofilm of *C. glabrata* (ATCC 90030), while on the biofilm of the association of the two strains this value dropped to 250 µg/mL. The DICF showed antifungal activity, being fungistatic against most of the tested species. In addition, it reduced the adherence and biofilm of *Candida* spp. In view of these results, it is necessary to carry out further analyzes such as antioxidant activity and toxicity tests with the DICF, aiming at a possible clinical use of the fraction as an alternative antifungal therapy in dentistry.

Keywords: *Sideroxylon*. *Candida*. Oral Candidiasis. Biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{g/mL}$ - Micrograma por mililitro

μL – Microlitro

AlCl_3 – Cloreto de alumínio

ANOVA- Análise de Variância

ATCC - American Type Culture Collection

CDCl_3 – Clorofórmio Deuterado

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical Laboratory and Standards Institute

MHz – Megahertz

mM - Milimol

MTT – Brometo de tiazolil- azul de tetrazólio

Na_2CO_3 – Carbonato do sódio

nm – Nanômetro

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm - Rotações por minuto

UEPB - Universidade Estadual da Paraíba

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Visão geral da árvore de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . Foto: Jose Malta Fontes/PortalMaltanet.....	18
Figura 2	Extrato hidroetanólico bruto das folhas de <i>S. obtusifolium</i> após rotaevaporação.....	22
Figura 3	Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de <i>S. obtusifolium</i> em ordem crescente de polaridade dos solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool n-butílico.....	23
Figura 4	Leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader)	26
Figura 5	Quantificação do teor de flavonoides totais presentes na fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> através de diluições em triplicata da fração e de quercetina baseado no método de Meda et al. (2015).....	27
Figura 6	Diluições seriadas (1:2) da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> e controles positivos.....	29
Figura 7	Soluções da fração do extrato de <i>S. obtusifolium</i> nas diferentes concentrações utilizadas para o ensaio da atividade antibiofilme.....	32
Figura 8	Sal de tetrazólio (MTT); MTT diluído em caldo Sabouraud Dextrose (0,5 mg/mL).....	33
ARTIGO - Efeito da fração diclorometano de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> T. D. Penn sobre o biofilme de espécies de <i>Candida</i>.		
Figura 1	Figura 1. Espectro de RMN ¹ H da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> (400 MHz, CDCl ₃).....	45
Figura 2	Efeito da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> e da Nistatina na cinética de crescimento de <i>C. albicans</i> (ATCC 10231).....	47
Figura 3	Atividade antiaderente e antibiofilme da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> e da nistatina sobre a atividade metabólica e a viabilidade celular de <i>C. albicans</i> (ATCC 10231), após 24h de exposição às diferentes concentrações das substancias.....	49
Figura 4	Atividade antiaderente e antibiofilme das diferentes concentrações da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> sobre a atividade metabólica e a viabilidade celular das leveduras testadas, após 24h de exposição à fração.....	50

Figura 5	Atividade antiaderente e antibiofilme da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> e da nistatina sobre a atividade metabólica e a viabilidade celular em cepas de <i>C.albicans</i> (ATCC 10231) e <i>C. glabrata</i> (ATCC 90030) associadas, após 24h de exposição às diferentes concentrações das substancias.....	51
Figura 6	Atividade antiaderente e antibiofilme da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> e da nistatina sobre a atividade metabólica e a viabilidade celular de <i>C.glabrata</i> (ATCC 90030), após 24h de exposição às diferentes concentrações das substancias.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise fitoquímica da fração diclorometano do extrato de folhas de <i>S. obtusifolium</i>	44
Tabela 2	Quantificação de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados da fração diclorometano do extrato hidroetanólico de <i>S. obtusifolium</i>	44
Tabela 3	Distribuição da CIM e da CFM da fração diclorometano do extrato de <i>S. obtusifolium</i> e controles positivos de acordo com as espécies de <i>Candida</i> . Os valores de CIM e CFM foram expressos em µg/Ml.....	46

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Delineamento do estudo	21
3.2 Local da pesquisa.....	21
3.3 Material botânico.....	21
3.4 Obtenção do extrato.....	22
3.5 Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de <i>S. obtusifolium</i>	22
3.6 Caracterização fitoquímica da FDIC de <i>S. obtusifolium</i>	23
3.6.1 <i>Screening</i> qualitativo	23
3.6.2 <i>Screening</i> quantitativo.....	25
3.6.3 Análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H da FDIC de <i>S. obtusifolium</i>	27
3.7 Microrganismos envolvidos	28
3.7.1 Reativação dos microrganismos e preparo do inóculo	28
3.8 Determinação da atividade antifúngica	28
3.9 Efeito da FDIC de <i>S. obtusifolium</i> sobre a cinética do crescimento de <i>Candida albicans</i>	30
3.10 Efeito antibiofilme da FDIC de <i>S. obtusifolium</i> frente a biofilme monoespécie e multiespécie de <i>Candida</i>	31
3.11 Aspectos Éticos.....	33
3.12 Análise dos dados	33
4 RESULTADOS	34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
6 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO.....	78

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os patógenos fúngicos emergentes representam uma ameaça crescente à saúde pública, segurança alimentar, e ecossistemas (GHOSH *et al.*, 2018). Mais de um bilhão de pessoas são diretamente afetadas por micoses globalmente, 150 milhões das quais têm uma infecção séria ou potencialmente fatal (GOW; NETEA, 2016; BONGOMIN *et al.*, 2017). A incidência de infecções fúngicas varia de acordo com condições socioeconômicas, regiões geográficas, hábitos culturais e o número de indivíduos portadores de fatores de risco para adquirir estas infecções (GIACOMAZZI *et al.*, 2016).

As infecções fúngicas invasivas estão aumentando paralelamente ao aumento da população de indivíduos imunossuprimidos, prescrição excessiva de quimioterápicos, agentes antifúngicos e esteroides, uso extensivo de cateteres, além de outros implantes médicos (LI *et al.*, 2018).

O envolvimento sistêmico grave de espécies de *Candida* pode causar morbidade e mortalidade significativas, principalmente em hospedeiros imunocomprometidos. Candidemias associadas à *Candida albicans* têm taxas de mortalidade que podem exceder 30% em certas populações. Pacientes gravemente neutropênicos, pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) e pacientes em UTI neonatal tendem a abrigar gêneros patológicos menos comuns de *Candida* (HELLSTEIN; MAREK, 2019).

Apesar do risco que as micoses representam, uma revisão do investimento no Reino Unido por instituições filantrópicas e de financiamento público descobriu que, entre 1997 e 2010, pesquisas relacionadas às micoses foram o foco de menos de 3% dos estudos financiados, ou 1,9% do investimento financeiro em todas as pesquisas sobre doenças infecciosas (GHOSH *et al.*, 2018).

A infecção fúngica humana mais comum é a candidose oral, que é caracterizada por um crescimento excessivo de espécies de *Candida* no epitélio superficial da mucosa oral (LYU *et al.*, 2016). Os microrganismos da microbiota oral podem viver harmonicamente na cavidade oral, porém quando há desequilíbrio na homeostase, podem provocar doenças no indivíduo, tais como cárie dentária, doença periodontal e candidose oral (CARTAXO-FURTADO *et al.*, 2015).

A candidose oral tem como causa mais comum a espécie *albicans* (ROQUE *et al.*, 2018), porém outras espécies do gênero *Candida* foram atribuídas à doença na cavidade oral: *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida*

parapsilosis, *Candida pseudotropicalis*, *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis* (HELLSTEIN; MAREK, 2019). Além de atuarem isoladamente, *Candida* spp. podem agir em combinações de duas ou mais espécies. Estudos demonstram que a associação da *C. albicans* com *C. glabrata* foi a mais prevalente em pacientes com HIV/AIDS (CLARCK-ORDÓÑEZ *et al.*, 2016) ou naqueles que apresentavam estomatite protética (MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015).

A candidose oral ocorre principalmente nos casos em que a imunidade está comprometida, afetando grande parte dos indivíduos da população, como pacientes transplantados, pacientes em terapia imunossupressora (SANGUINETTI *et al.*, 2015), pacientes com idade avançada, desnutrição, doença metabólica, infecções concomitantes, hipofunção da glândula salivar (HELLSTEIN; MAREK, 2019), recém-nascidos, pacientes com câncer oral sob terapia antineoplásica, usuários de próteses, entre outros, apresentando diferentes características clínicas (PEREIRA *et al.*, 2016).

A apresentação clínica mais comum de candidose oral é a pseudomembranosa, caracterizada por apresentar placas moles, multifocais ou difusas, ligeiramente elevadas, localizadas especialmente na mucosa jugal, língua, palato e região retromolar (CASTRO *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2013). A candidose atrófica aguda mostra uma mucosa eritematosa, mas sem a presença de pseudomembrana, podendo ser localizada ou generalizada. Sua natureza dolorosa é o que traz o paciente à clínica (HELLSTEIN; MAREK, 2019). A candidose atrófica crônica, geralmente assintomática, aparece na forma de uma ou mais manchas de coloração vermelha, frequentemente observada em indivíduos imunocomprometidos, em usuários de fármacos imunossupressores e de prótese. (ORENSTEIN; TAYLOR, 2014; REINHARDT *et al.*, 2020). Outro tipo de candidose oral é a queilite angular, em que o paciente pode ser assintomático ou apresentar sensibilidade, eritema e fissura nas comissuras labiais (SIMÕES *et al.*, 2013; HELLSTEIN; MAREK, 2019).

A patogenicidade de *C. albicans* está associada com sua capacidade dimórfica, ou seja, mudança da forma leveduriforme para hifa (GOW *et al.*, 2013). A forma hifal é capaz de penetrar nas superfícies epiteliais e danificar os tecidos do hospedeiro, levando ao processo de infecção (TEODORO *et al.*, 2018). A transição de filamentos de levedura para hifas ocorre em resposta a uma ampla variedade de condições do hospedeiro que podem ser reproduzidas em estudos *in vitro*, como temperatura corporal (37°C), alta concentração de CO₂, fontes de carbono ou aminoácidos e matriz extracelular de biofilmes microbianos (DE BARROS *et al.*, 2017).

Outros fatores de virulência de *Candida* spp. incluem a capacidade de adesão às células epiteliais do tecido oral humano, troca fenotípica, secreção de enzimas hidrolíticas e formação de biofilme (SOUZA *et al.*, 2018). A adesão é o primeiro passo para o desenvolvimento da candidose e pode ocorrer tanto em células como em superfícies de dispositivos médicos, geralmente levando à formação de biofilme. Assim, a adesão é uma etapa fundamental para um processo infeccioso, que é influenciado pela composição das paredes celulares de leveduras e pelas características da superfície à qual as células de levedura aderem (PARK *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2017).

Biofilmes são comunidades de microrganismos ligados a superfícies bióticas ou abióticas, incorporado em uma matriz de substância polimérica extracelular difícil de eliminar (SOUZA *et al.*, 2018). A habilidade de formar biofilmes é um dos maiores fatores de virulência da *C. albicans* (TEODORO *et al.*, 2018), pois confere tolerância significativa à terapia antifúngica, principalmente limitando a penetração de substâncias através da matriz extracelular e resistência a ataques de células fagocíticas. Talvez a propriedade específica do biofilme mais relevante clinicamente seja o desenvolvimento de resistência antifúngica das células que o compõem, onde concentrações inibitórias mínimas (CIM) podem ser até 1000 vezes maior do que as encontradas para células planctônicas (SOUZA *et al.*, 2018).

O arsenal de antifúngicos para o tratamento da candidose oral é restrito, por exemplo, aos azóis (miconazol, fluconazol, clotrimazol e itraconazol) e nistatina (polieno) (PATIL *et al.*, 2015). Esses fármacos disponíveis no mercado são eficazes, mas têm efeitos adversos, como reações alérgicas e interações antagônicas com outros fármacos (BAKHSHI *et al.*, 2012). Além disso, o uso da nistatina pode apresentar reações gastrointestinais, incluindo vômitos, náuseas, diarreia, anorexia e dor abdominal (LYU *et al.*, 2016).

Ademais, como consequência do amplo uso de agentes antifúngicos, observa-se que a resistência de *Candida albicans* aos fármacos convencionais está aumentando, o que representa uma séria ameaça à terapia antifúngica (LI *et al.*, 2018). O alto grau de resistência de *C. albicans* associada ao biofilme é um dos principais fatores que dificultam o desenvolvimento de coeficiente de eficácia satisfatório (SILVA *et al.*, 2017). O principal mecanismo de resistência fúngica provém de mutações impostas por pressões seletivas diante do uso indiscriminado dos antifúngicos tradicionais (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Segundo uma revisão compartilhada por O'Neill (2014) sobre a resistência aos antimicrobianos, a mesma causará, entre os anos de 2014 a 2050, um impacto no PIB mundial de mais de 100 trilhões de dólares. Além disso, o número de mortes por ano no mesmo período

será de mais de 390.000 na América Latina, sendo o continente asiático e o africano os mais atingidos com mais de 4.000.000 de mortes por ano.

A resistência microbiológica envolve mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microrganismo e confere a ele a resistência inata antes da exposição deste ao antifúngico. Já a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Fatores de transcrição mutantes contribuem com a formação de resistência microbiológica aos antifúngicos. Em *C. albicans*, a falta de recombinação sexual leva à aquisição de resistência aos fármacos através da plasticidade do genoma e aumento de taxas de mutação e de recombinação mitóticas. Porém, a resistência mediada por bombas de efluxo é uma das mais comuns (FORD *et al.*, 2015). Mutações em genes que interferem na regulação das bombas de efluxo podem levar à superexpressão destas, fato que ocorre em certos casos de resistência, onde a concentração de antifúngico no microrganismo e sua ação são alterados pela retirada de droga (LO *et al.*, 2015; JENSEN *et al.*, 2015).

Assim, a procura por terapêuticas alternativas eficazes de controle microbiológico para uso em seres humanos levou ao crescente interesse pelas plantas medicinais devido ao seu potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes com menos efeitos adversos em comparação com fármacos convencionais existentes, fornecendo assistência médica aos profissionais com opções viáveis para o tratamento de doenças orais (ALMEIDA *et al.*, 2018).

A Caatinga brasileira constitui um bioma único que despertou atenção por sua biodiversidade exuberante e inexplorada (ARAÚJO-NETO *et al.*, 2010) sendo um ecossistema que cobre cerca de 1 milhão de Km² do Nordeste brasileiro (FIGUEIREDO; LIMA, 2015). Sua vegetação xerófila característica é afetada por secas prolongadas e irregulares, altas temperaturas e elevadas radiações ultravioletas (FIGUEIREDO; LIMA, 2015).

Sideroxylon obtusifolium, pertencente à família Sapotaceae (GOMES *et al.*, 2010), conhecida no Brasil como “quixabeira”, “quixaba” ou “rompe-gibão”, é uma espécie de planta medicinal nativa da caatinga brasileira (Figura 1) (ARAÚJO-NETO *et al.*, 2010). As suas folhas e cascas são popularmente usadas em forma de chás, com diversas finalidades terapêuticas como ação anti-inflamatória, gastrite, cólicas, problemas renais, úlcera duodenal, azia e problemas cardíacos (AQUINO *et al.*, 2016).



Figura 1. Visão geral da árvore de *Sideroxylon obtusifolium*. Foto: Jose Malta Fontes/Portal Maltanet

Segundo Passos-Oliveira *et al.* (2012), os estudos químicos e farmacológicos de *S. obtusifolium* são poucos e, até alguns anos atrás, apenas triterpenóides pentacíclicos comuns haviam sido relatados em sua composição. Os autores isolaram quatro saponinas e dez flavonoides glicosilados da fração solúvel em butanol do extrato etanólico das folhas da planta. Araújo-Neto *et al.* (2010) encontraram a presença de saponinas, esteroides, fenóis, taninos, triterpenos, xantonas, flavanonas e flavononóis como constituintes do extrato etanólico de *S. obtusifolium*. De Aquino *et al.* (2017) isolaram N-metil- (2S, 4R) - trans -4-hidroxi-l-prolina (NMP) do extrato metanólico das folhas de *S. obtusifolium* afirmando apresentar atividade antinociceptiva e principalmente anti-inflamatória.

Diante do uso popular constante desse vegetal, pesquisas que comprovem cientificamente a atividade anti-inflamatória (ARAÚJO-NETO *et al.*, 2010; AQUINO *et al.*, 2016; DE AQUINO *et al.*, 2017; DE AQUINO *et al.*, 2019), antioxidante (FIGUEIREDO; LIMA, 2015) e antimicrobiana (ELLER *et al.*, 2015; AQUINO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; SAMPAIO *et al.*, 2017) de *S. obtusifolium* têm sido realizadas.

Ao estudar a atividade antifúngica frente às espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, Silva *et al.* (2017) afirmam que o extrato etanólico e a fração metanólica das folhas *S. obtusifolium* apresentaram potencial antifúngico, com diâmetro dos halos de inibição variando entre 24,5-19,5 mm e 25,0-18,0 mm, respectivamente. Os melhores resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram registrados para o extrato etanólico das folhas de *S. obtusifolium* com valores de 0,16 mg/mL para *C. albicans* e *C. glabrata* e 0,32 mg/mL para *C. tropicalis*.

Pereira *et al.* (2016) afirmam que a fração diclorometano (FDIC) das folhas de *S. obtusifolium* mostrou fraca atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM = 1000

µg/mL). No entanto, a fração n-butanol do extrato revelou forte atividade sobre o crescimento dessa espécie, apresentando CIM de 62,5 µg/mL, porém mostrou citotoxicidade em macrófagos murinos (RAW 264.7) em concentrações próximas a CIM/CFM, não afetando a viabilidade de queratinócitos humanos.

Sampaio *et al.* (2017), avaliando a atividade antimicrobiana das frações do extrato hidroalcoólico das folhas e cascas de *S. obtusifolium* observaram que a FDIC e a fração n-butanol do extrato de *S. obtusifolium* apresentaram atividade inibitória promissora sobre o crescimento de *C. albicans*, com valores de CIM e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para as duas frações de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente, quando utilizadas as folhas da planta.

Diante disso, como também da escassa literatura envolvendo estudos com a utilização da FDIC de *Sideroxylon obtusifolium*, torna-se relevante investigar o efeito inibitório desta fração sobre o crescimento, adesão e formação de biofilme de espécies fúngicas do gênero *Candida*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o perfil fitoquímico bem como analisar *in vitro* a atividade antifúngica e antibiofilme da FDIC de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn sobre espécies do gênero *Candida*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil fitoquímico da FDIC de *S. obtusifolium* por meio de *Screening* qualitativo e quantitativo;
- Avaliar a presença de classes de metabólitos secundários da FDIC por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H ;
- Avaliar a atividade antifúngica da FDIC de *S. obtusifolium* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 34135), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e cepas clínicas de *C. albicans* (A4), *C. albicans* (A5) e *C. albicans* (A6);
- Determinar, a ação da FDIC sobre a cinética de crescimento em *C. albicans* utilizando a curva de *Time Kill*;
- Analisar a atividade antiaderente e antibiofilme da FDIC por meio de ensaios de inibição da aderência fúngica e de inibição em biofilmes maduros em *C. albicans*, *C. glabrata* e na associação entre as duas cepas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um ensaio laboratorial experimental *in vitro*.

3.2 Local da pesquisa

As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Estadual da Paraíba/UEPB e no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises da Universidade Federal da Paraíba/UFPB.

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Análises e Diagnóstico e no Laboratório de Patologia do Departamento de Odontologia da UEPB.

3.3 Material botânico

As folhas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn foram coletadas no período matutino, no mês de abril de 2017, na região do semiárido nordestino, zona rural do município de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil (7° 22' 25''S, 35° 59' 32''W).

O espécime de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. usado nesse estudo foi semelhante ao usado por Pereira *et al.* (2016) que foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, onde encontra-se identificado com o número de voucher: JPB 57.985. A presente pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados do Ministério do Meio Ambiente sob o número A39F2C5.

O material vegetal foi acondicionado em sacolas de papel e em seguida foi realizada a limpeza do mesmo, eliminando folhas impregnadas por líquens ou matéria contaminante, espinhos e demais partes aéreas presentes nas folhas, que pudessem interferir no padrão de qualidade da planta em estudo.

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante (FANEM – Modelo 330/ 5) a 40°C, por um período de 14 dias até a estabilização final do peso. Posteriormente, foram moídas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30), com diâmetro da partícula de 10

mesh. O peso inicial das folhas foi de 1,223 kg, mas após a secagem, esse valor foi reduzido para 770 g de folhas.

3.4 Obtenção do extrato

Foi preparado um extrato hidroetanólico (7:3 – v:v) das folhas de *S. obtusifolium* T. D. Penn na proporção 200 g planta seca e moída para 1 litro de solvente. O método de extração utilizado foi o da maceração. O extrato foi acondicionado em recipientes de vidro âmbar protegidos da luz e conservados sob refrigeração.

O extrato hidroetanólico foi evaporado em evaporador rotativo a 40°C, com rotação de 70 rpm para eliminação do solvente (Figura 2). Posteriormente foi liofilizado (Liofilizador LS 3000 Terroni®) sob temperatura de -20°C a -40°C, fornecendo 47g do extrato hidroetanólico liofilizado (EHL).



Figura 2. Extrato hidroetanólico bruto das folhas de *S. obtusifolium* após rotaevaporação.

3.5 Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de *S. obtusifolium*

O EHL foi redissolvido em uma solução de 50 mL de metanol: água (7:3 - v:v) e particionado em um funil de separação (DA CUNHA *et al.*, 2013) utilizando-se os seguintes solventes em grau crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool n-butílico (Figura 3). Esta solução foi levada ao funil de separação, no qual foram adicionados 50 mL dos solventes, na ordem descrita acima. Inicialmente, agitou-se e observou-se a separação da fase. Os solventes foram utilizados até o esgotamento total dos compostos da solução-mãe.

Cada passagem dos solventes pela solução-mãe foi coletada, em seguida cada fração foi submetida ao evaporador rotativo a 40°C, com rotação de 70 rpm e ao liofilizador (Liofilizador LS 3000 Terroni®) sob temperatura de -20°C a -40°C, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração. A fração que foi utilizada para os testes de atividade antimicrobiana foi a diclorometano, cujo peso final do pó foi de 6g.



Figura 3. Fracionamento líquido-líquido do extrato bruto de *S. obtusifolium* em ordem crescente de polaridade dos solventes: hexano (A), diclorometano (B), acetato de etila (C) e álcool n-butílico (D).

3.6 Caracterização fitoquímica da FDIC de *S. obtusifolium*

3.6.1 *Screening* qualitativo

A investigação fitoquímica da FDIC de *S. obtusifolium* foi realizada seguindo o método de Matos (2009) e Costa (2010).

3.6.1.1 Testes que utilizam água destilada como solvente

Foi preparada uma solução mãe, pesando 140 mg da FDIC, dissolvida em 28mL de água destilada e posteriormente a solução foi filtrada.

3.6.1.1.1 Saponinas

Para a investigação da presença de saponinas, 5 mL da solução mãe foram diluídos em 15 mL de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente durante 2 minutos. Após esse tempo, foi verificado se havia ou não presença de espuma permanente, a qual sugere a presença de saponinas.

3.6.1.1.2 Polissacarídeos

Para investigar a presença de polissacarídeos, 5 mL dessa mesma solução mãe foram colocados em contato com 5 gotas de lugol. O aparecimento da coloração azul indicou resultado positivo para presença de polissacarídeos.

3.6.1.1.3 Taninos e fenólicos totais

A identificação de taninos e fenólicos totais necessitou da adição de 2 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico a 1% em 5 mL da solução mãe. Mudança na coloração ou formação de precipitado indicou reação positiva para estes compostos. Uma coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis. Um precipitado de tonalidade azul escuro indica taninos pirogálicos, e verde, presença de taninos catéquicos.

3.6.1.2 Testes que utilizam metanol como solvente

Foi preparada uma solução mãe com 120 mg da FDIC dissolvida em 24 mL de metanol e posteriormente a solução foi filtrada.

3.6.1.2.1 Flavonoides

Para identificação de flavonoides, foram acrescentadas 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e raspas de magnésio a 10 mL dessa solução mãe. O surgimento de uma coloração rósea-alaranjada indicou reação positiva para flavonoides.

3.6.1.3 Testes que utilizam clorofórmio como solvente

Foi preparada uma solução mãe contendo 75 mg da FDIC dissolvidos em 15 mL de clorofórmio e posteriormente a solução foi filtrada.

3.6.1.3.1 Esteroides e Triterpenos

Para a verificação da presença de esteroides e triterpenos 10 mL dessa solução mãe foram filtrados sobre carvão ativado. Posteriormente foram adicionados 1 mL de anidrido acético e o tubo foi agitado. Logo após, foram adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado e novamente o tubo foi agitado. O rápido desenvolvimento das cores que variam do azul evanescente ao verde persistente indicou resultado positivo para estes compostos.

3.6.1.4 Outros testes

Por fim, para a investigação da presença de alcaloides, 25 mg da FDIC foram dissolvidas em 5 mL de solução de ácido clorídrico 5% e filtradas. Após a filtração, essa solução foi separada em três tubos de ensaios diferentes. Em cada tubo foram adicionados reagentes de Bouchard, Dragendorff e Mayer. A precipitação ou turvação em pelo menos um dos tubos indicou resultado positivo para alcaloides.

3.6.2 *Screening* quantitativo

O perfil fitoquímico da FDIC de *S. obtusifolium* também foi determinado por meio da quantificação do teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados.

Para a determinação do teor de polifenóis totais, foi utilizado um método baseado no estudo descrito por Chandra e De Mejía Gonzalez (2004). Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 100 μL da solução aquosa da fração do extrato (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na primeira fileira e 50 μL de água destilada nas fileiras seguintes. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) com a transferência de 50 μL da fração aos poços subsequentes. Após essa etapa, 50 μL do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados aos poços e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 μL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader) (Figura 4) contra um branco composto por água destilada e a fração. A análise foi realizada em triplicata.

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 5 mg do padrão em 50 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20,

25, 30, 35, e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico.



Figura 4. Leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader)

A determinação do conteúdo de flavonoides totais baseou-se em um método proposto por Meda *et al.* (2005). Inicialmente foi preparada a solução da fração do extrato diluída em metanol (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 200 μL da solução da fração do extrato na primeira fileira e 100 μL de metanol nas fileiras seguintes. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) com a transferência de 100 μL da fração aos poços subsequentes. Após essa etapa, 100 μL de AlCl_3 a 2% (p/v) foram adicionados aos poços e esta mistura permaneceu em repouso por 10 minutos (Figura 5A). Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância a 415 nm em leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader) contra um branco composto por metanol e a fração. A análise foi realizada em triplicata.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quercetina, preparada pela dissolução de 5 mg do padrão em 50 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 5B). A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina.

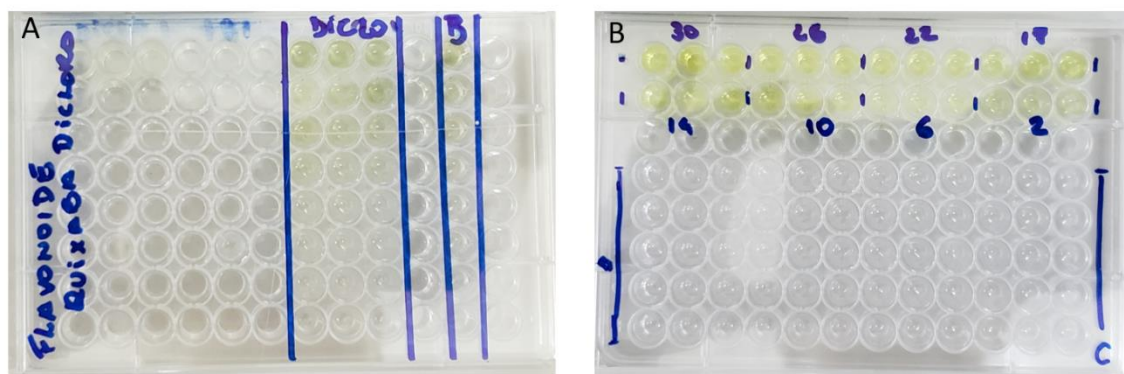


Figura 5. Quantificação do teor de flavonoides totais presentes na fração diclorometano do extrato de *S. obtusifolium* através de diluições em triplicata da fração (A) e de quercetina (B) baseado no método de Meda *et al.* (2015).

O teor de taninos condensados foi quantificado baseando-se no método de Makkar e Becker (1993). Inicialmente foi preparada a solução da fração do extrato diluída em metanol (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 50 μL da solução da fração do extrato na primeira fileira e 25 μL de metanol nas fileiras seguintes. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) com a transferência de 25 μL da fração aos poços subsequentes. Após essa etapa, 150 μL da solução de vanilina (4% p/v em metanol) foram adicionados aos poços e em seguida foram colocados 75 μL de ácido clorídrico concentrado (37%). Esta mistura permaneceu em repouso por 20 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância a 500 nm em leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader) contra um branco composto por metanol e a fração. A análise foi realizada em triplicata.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 5 mg do padrão em 50 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. Foram feitas seis replicatas para cada solução de catequina.

3.6.3 Análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H da FDIC de *S. obtusifolium*

O espectro de RMN de ^1H foi obtido em um espectrômetro Bruker Ascend operando a 400 MHz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o próprio solvente foi usado como referência interna.

3.7 Microrganismos envolvidos

Foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) provenientes da Fundação Oswaldo Cruz/RJ. Os isolados clínicos, *Candida albicans* (A4, A5 e A6), estão estocados em amostras no Laboratório de Patologia, no Departamento de Odontologia da UEPB.

3.7.1 Reativação dos microrganismos e preparo do inóculo

As cepas de coleção de cultura e de isolados clínicos foram reativados a partir de sua cultura original em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Paraná, Brasil) e incubados a 37°C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi, Paraná, Brasil). Em seguida, a concentração de células foi determinada com auxílio de espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm e absorvância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, essa concentração foi diluída 1000× em caldo Sabouraud Dextrose, obtendo-se finalmente a concentração de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante os testes de atividade antimicrobiana, esta concentração caiu pela metade, resultando em $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (CLSI, 2008).

3.8 Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica da FDIC de *S. obtusifolium* foi determinada segundo a normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A partir desta, foram obtidas a CIM e a CFM frente às cepas de coleção de cultura e de isolados clínicos citados anteriormente, como também em associação de *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Microplacas com 96 poços (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100 µL de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose em todos os poços. Em seguida, 100 µL da FDIC de *S. obtusifolium* (4000 µg/mL) foram inseridos na primeira fileira de poços da

microplaca. Diluições seriadas (1:2) foram então realizadas por meio da transferência de 100 μL aos poços subsequentes (Figura 6). Em seguida, 100 μL da suspensão dos microrganismos foram inseridos em todos os poços. Desse modo, a fração foi ensaiada entre o intervalo das concentrações 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Controles farmacológicos com fluconazol e nistatina (controles positivos) foram utilizados e realizados nas concentrações que variaram entre 64 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços), e do veículo (etanol a 40%) foram realizados para garantir acurácia do método.



Figura 6. Diluições seriadas (1:2) da fração diclorometano do extrato de *S. obtusifolium* e controles positivos.

As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados. A viabilidade dos microrganismos foi determinada pela utilização do corante resazurina (3 mM), o qual foi pipetado 50 μL em todos os poços após o período de incubação para determinação da CIM (24 h). A metabolização do corante pelos microrganismos viáveis resulta na produção de um pigmento de cor rosa.

A CFM foi determinada pela semeadura (10 μL) em placas de ágar Sabouraud Dextrose, de todos os poços correspondentes a concentrações iguais ou superiores a CIM. Após semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A CFM foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos subcultivos. As análises de CIM e CFM foram realizadas em triplicata, em três experimentos independentes.

A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se a substância tinha uma atividade fungistática (CFM/CIM ≥ 4) ou fungicida (CFM/CIM < 4) (SIDDIQUI *et al.*, 2013).

3.9 Efeito da FDIC de *S. obtusifolium* sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

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

Foi utilizada nesse teste cepa de referência de *C. albicans* (ATCC 10231). O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do inóculo e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos microrganismos equivalentes a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL.

Microplacas com 96 poços de fundo chato foram preparadas, inserindo-se 100 μ L de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi, Paraná, Brasil) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 μ L da FDIC de *S. obtusifolium*, de modo que nos primeiros poços a concentração da substância teste foi 2000 μ g/mL (4x CIM). O mesmo procedimento foi feito para o controle farmacológico (Nistatina). Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) e controle do veículo (diluyente do extrato) foram também realizados e avaliados para garantir acurácia do método. Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 μ L de alíquotas da primeira fileira de poços aos subsequentes. Em seguida, 100 μ L da suspensão dos microrganismos diluído em caldo Sabouraud Dextrose foram inseridos em todos os poços (Concentração no poço: $2,5 \times 10^3$ UFC/mL). Posteriormente, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008).

Para esse teste, as concentrações avaliadas para a fração do extrato (500 μ g/mL, 1000 μ g/mL e 2000 μ g/mL) e para a nistatina (2 μ g/mL, 4 μ g/mL e 8 μ g/mL) correspondeu àquelas equivalentes a CIM, 2x CIM e 4x CIM.

Foi realizada a semeadura de alíquotas de 10 μ L em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 24 h. Decorrido esse período, o número de microrganismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para cada concentração e tempo de análise. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes. Desse modo, pôde-se determinar o efeito das

substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *C. albicans*.

3.10 Efeito antibiofilme da FDIC de *S. obtusifolium* frente a biofilme monoespécie e multiespécie de *Candida*

A eficácia antibiofilme da FDIC de *S. obtusifolium* foi avaliada por meio de ensaios de inibição da aderência fúngica e de biofilme maduro, em microplacas de 96 poços, conforme metodologia descrita a seguir.

Para esses ensaios, foram utilizadas suspensões individuais ($5,0 \times 10^5$ células/mL) de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (ATCC 90030), bem como suspensões mistas desses microrganismos em igual proporção. Para todos os experimentos foram utilizados um controle de crescimento (sem adição de antimicrobianos), controle farmacológico (Nistatina), controle de veículo (dilúente do extrato), além do controle de esterilidade do meio de cultura.

Para o ensaio de atividade antiaderente, microplacas de 96 poços contendo 100 µL das suspensões individuais dos microrganismos foram incubadas (37°C, em aerobiose por 24 h) com 100 µL de caldo nutritivo (Sabouraud Dextrose suplementado com 4% sacarose) e 100 µL da fração (Figura 7) e da nistatina nas concentrações CIM, 2x CIM e 4x CIM. Após esse período, o conteúdo líquido foi removido e o biofilme formado sobre o fundo das placas foi coletado por meio da suspensão em 200 µL de solução salina. O biofilme formado foi analisado quanto ao número de microrganismos viáveis (UFC/mL) e a atividade metabólica por meio de ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT).

Para o ensaio de inibição de biofilmes maduros, em microplacas de 96 poços foram inseridos 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose suplementado com 4% sacarose e 100 µL da suspensão de microrganismos. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h, a 37°C, em aerobiose, para desenvolvimento e maturação desses biofilmes. Após esse período, o conteúdo dos poços foi removido sem provocar irrupção dos biofilmes formados, sendo posteriormente inseridos 100 µL de caldo nutritivo (Sabouraud Dextrose suplementado com 4% sacarose) e 100 µL da fração (Figura 7) e da nistatina nas concentrações de CIM, 2x CIM e 4x CIM. As placas foram então novamente incubadas por um período de 24 h, a 37°C, em aerobiose. Após o período proposto, o sobrenadante foi removido e o biofilme remanescente coletado pela suspensão em 200 µL de solução salina. O biofilme remanescente foi analisado quanto ao número de microrganismos viáveis (UFC/mL) e atividade metabólica (ensaio de redução do sal de MTT) (CLSI, 2008).

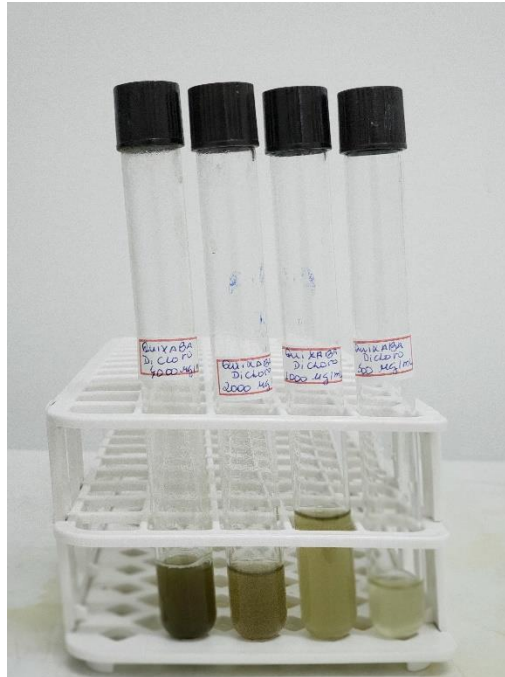


Figura 7. Soluções da fração do extrato de *S. obtusifolium* nas diferentes concentrações utilizadas para o ensaio da atividade antibiofilme.

Para análise de microrganismos viáveis, a suspensão de biofilme recuperada do fundo dos poços da placa foi diluída seriadamente (10^{-1} até 10^{-5}) e subcultivada (10 μ L, em triplicada) em placas de Ágar Saboraud Dextrose, sendo determinado o número de colônias viáveis (CAVALCANTI *et al.*, 2016). A atividade metabólica foi avaliada por meio do ensaio de redução do sal de MTT (Figura 8A). Para tanto, os biofilmes remanescentes foram incubados com 200 μ L de MTT diluídos em caldo Sabouraud Dextrose (0,5 mg/mL) (Figura 8B). Após o período de 3 h, o sobrenadante foi removido e as células remanescentes foram tratadas com 200 μ L de isopropanol ácido (95:5 v/v álcool isopropílico: ácido clorídrico) para solubilização do corante formazan. As células foram incubadas novamente por 15 min a 37°C e posteriormente avaliadas em leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader) com um comprimento de onda de 490 nm. (CAVALCANTI *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2018). Os testes foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

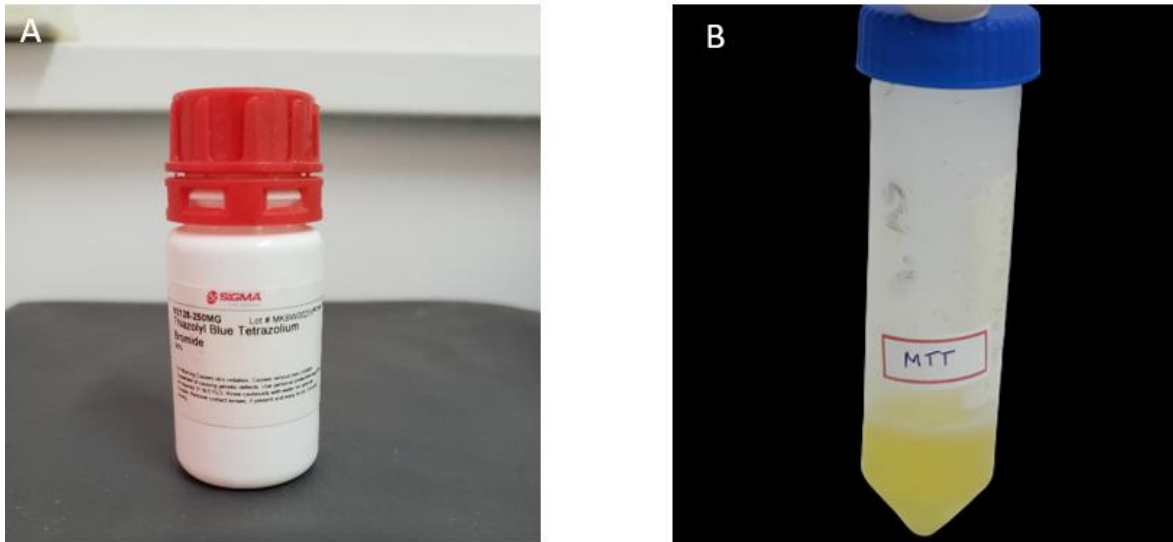


Figura 8. Sal de tetrazólio (MTT) (A); MTT diluído em caldo Sabouraud Dextrose (0,5 mg/mL) (B).

3.11 Aspectos Éticos

Em respeito à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS), que regulamenta a ética na pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, este estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), registrado na Plataforma Brasil no site do Ministério da Saúde e aprovado com o seguinte CAAE: 16618919.4.0000.5187.

3.12 Análise dos dados

Os resultados dos ensaios da ação da FDIC sobre a cinética do crescimento de *C. albicans* e da eficácia antibiofilme foram analisados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS para Windows, versão 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, EUA) com um nível de significância de 5%. O teste de variância a um fator fixo (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey foram empregados para checar diferenças nas variáveis dependentes entre os grupos.

4 RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão apresentados no formato de artigo científico a seguir.

**EFEITO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn
SOBRE O BIOFILME DE ESPÉCIES DE *Candida*.**

Periódico: Archives of Oral Biology

Qualis CAPES: A1

Fator de Impacto 2019: 1.931

Formatado de acordo com as normas do periódico (Anexo A)

**EFEITO DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE *Sideroxylon obtusifolium* T. D.
Penn SOBRE O BIOFILME DE ESPÉCIES DE *Candida*.**

Bruna Palmeira Costa^a; Jozinete Vieira Pereira^{*a}

^aPrograma de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

* Autor correspondente:

Jozinete Vieira Pereira Marques

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

Telefone: (83) 981455427

E-mail: jozinetevieira@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: Analisar o perfil fitoquímico da fração diclorometano (FDIC) das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* T. D. Penn bem como avaliar sua atividade antifúngica e antibiofilme sobre espécies do gênero *Candida* spp. *Metodologia:* A caracterização fitoquímica da fração foi realizada por meio de *screening* qualitativo, quantitativo e de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo contra espécies de *Candida*, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Foi observada a atividade antifúngica da FDIC sobre a cinética de crescimento (Curva *Time-Kill*) de *C. albicans* (ATCC 10231). A inibição da aderência e biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e da associação entre as duas leveduras foi avaliada com base no número de unidades formadoras de colônias (UFC) e atividade metabólica (MTT). Os dados foram analisados através do teste ANOVA one-way e pós teste de Tukey ($\alpha=0.05$). *Resultados:* A caracterização fitoquímica sugeriu a presença majoritária de saponinas e compostos fenólicos. A fração apresentou valores de CIM entre 250 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ e CFM entre 1000 $\mu\text{g/mL}$ e >1000 $\mu\text{g/mL}$, com atividade fungistática contra a maioria das cepas estudadas. A concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ (4xCIM) da fração apresentou atividade fungicida por 24 h contra *C. albicans* e foi a mais eficaz na redução da aderência e biofilme dessa cepa. A fração na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (4xCIM) foi eficaz na redução da adesão e biofilme de *C. glabrata*, enquanto que no biofilme da associação das duas cepas esse valor caiu para 250 $\mu\text{g/mL}$ (CIM). *Conclusão:* A fração diclorometano apresentou atividade antifúngica, reduzindo a aderência e o biofilme de espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Sideroxylon*, *Candida*, Candidíase oral, Biofilme

INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* são microrganismos de interesse médico devido à alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. *Candida* spp. aparecem como leveduras colonizadoras da mucosa oral em cerca de 20 a 80% dos adultos saudáveis sem evidência de infecção (Souza et al., 2018). Sua transição para uma forma patogênica ocorre quando predominam os fatores de virulência em relação aos mecanismos de defesa do hospedeiro, originando infecção (Ferreira et al., 2015). Os fatores de virulência de *Candida* spp incluem a capacidade de adesão às células epiteliais do tecido oral humano, troca fenotípica, secreção de enzimas hidrolíticas e formação de biofilme (Souza et al., 2018).

A candidose oral é uma importante infecção fúngica oportunista, em que *Candida albicans* é a causa mais comum (Roque et al., 2017), sendo que outras espécies do gênero *Candida* também foram atribuídas à doença na cavidade oral: *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis* (Hellstein, & Marek, 2019). Ocorre principalmente nos casos em que a imunidade está comprometida e é considerada um problema de saúde global que afeta grande parte dos indivíduos da população, como recém-nascidos, pacientes com câncer bucal, usuários de próteses, entre outros, apresentando diferentes características clínicas. (Pereira et al., 2016).

Um biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos organizados em interfaces, dentro de uma matriz polimérica autoproduzida e aderidos a um tecido inerte ou vivo (Rasteiro et al., 2014). Essa matriz protege as células fúngicas dos antimicrobianos, o que dificulta o tratamento dos biofilmes. Existem duas maneiras usuais de tratar biofilmes. A primeira é impedir a formação do biofilme, evitando sua aderência ou maturação. A segunda consiste na erradicação do biofilme (Girardot, & Imbert, 2016). Idealmente, um bom candidato para o tratamento de biofilmes de *Candida* deve ser eficaz em ambas as formas de tratamento. (Teodoro et al., 2018).

O arsenal de antifúngicos para o tratamento da candidose oral é restrito, por exemplo, aos azóis (miconazol, fluconazol, clotrimazol e itraconazol) e polieno (nistatina) (Patil, Rao, Majumdar, Anil, 2015). Esses fármacos disponíveis no mercado são eficazes, mas têm efeitos adversos, como reações alérgicas, interações antagônicas com outros fármacos e efeitos gastrointestinais como vômitos, náuseas e diarreia (Bakhshi et al., 2012; Lyu et al., 2016). Além disso, como consequência do amplo uso de agentes antifúngicos, observa-se que a resistência de *C. albicans* aos fármacos está aumentando, o que representa uma séria ameaça à terapia antifúngica (Li et al., 2018).

Segundo uma revisão compartilhada por O’Neill (2014) sobre a resistência aos antimicrobianos, a mesma causará, entre os anos de 2014 a 2050, um impacto no PIB mundial de mais de 100 trilhões de dólares. Além disso, o número de mortes por ano no mesmo período será de mais de 390.000 na América Latina, sendo o continente asiático e o africano os mais atingidos com mais de 4.000.000 de mortes por ano. Diante disso, experimentos com plantas medicinais em busca de novos compostos bioativos se apresentam como uma alternativa promissora (Rocha et al., 2013).

A Caatinga brasileira constitui um bioma único que despertou atenção por sua biodiversidade exuberante e inexplorada (Araújo-Neto et al., 2010) sendo um ecossistema que cobre cerca de 1 milhão de Km² do nordeste brasileiro (Figueiredo, & Lima, 2015). Sua vegetação xerófila característica é afetada por secas prolongadas e irregulares, altas temperaturas e elevadas radiações ultravioletas (Figueiredo, & Lima, 2015).

Sideroxylon obtusifolium, pertencente à família Sapotaceae (Gomes et al., 2010), conhecida no Brasil como “quixabeira”, “quixaba” ou “rompe-gibão”, é uma espécie de planta medicinal nativa da caatinga brasileira (Araújo-Neto et al., 2010). As suas folhas e cascas são popularmente usadas em forma de chás, com diversas finalidades terapêuticas como ação anti-inflamatória e contra gastrite, cólicas, problemas renais, úlcera duodenal, azia e problemas cardíacos (Aquino et al., 2016).

Em vista do uso popular constante desta planta, pesquisas que comprovem cientificamente sua atividade anti-inflamatória (Araújo-Neto et al., 2010; Aquino et al., 2016; De Aquino et al., 2017; De Aquino et al., 2017; De Aquino et al., 2019), antioxidante (Figueiredo, & Lima, 2015) e antimicrobiana (Eller et al., 2015; Aquino et al., 2016; Pereira et al., 2016; Silva, Oliveira, & Cavalcante, 2017; Sampaio et al., 2017) foram realizadas.

Diante disso, como também da escassa literatura envolvendo estudos com a utilização da FDIC de *Sideroxylon obtusifolium*, torna-se relevante investigar o efeito inibitório desta fração sobre o crescimento, adesão e formação de biofilme de espécies fúngicas do gênero *Candida*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo do extrato da planta e fracionamento

As folhas de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. Penn foram colhidas em abril de 2017, no município de Campina Grande, região semi-árida do estado da Paraíba, no Nordeste do Brasil (7° 22′ 25″ S, 35° 59′ 32″ W). O espécime de *Sideroxylon obtusifolium* T.D. usado nesse estudo

foi semelhante ao usado por Pereira et al. (2016) que foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, onde encontra-se identificado com o número de voucher: JPB 57.985. A presente pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados do Ministério do Meio Ambiente sob o número A39F2C5.

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante (FANEM – Modelo 330/ 5) a 40°C, por 14 dias até a estabilização final do peso. Posteriormente, foram moídas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30), com diâmetro da partícula de 10 mesh. O peso inicial das folhas foi de 1,223 kg, mas após a secagem, esse valor foi reduzido para 770 g de folhas.

Foi preparado um extrato hidroetanólico (7:3 – v:v) das folhas de *S. obtusifolium* T. D. Penn na proporção 200 g planta seca e moída para 1 litro de solvente. O método de extração utilizado foi o da maceração. O extrato hidroetanólico foi evaporado em evaporador rotativo a 40°C, com rotação de 70 rpm para eliminação do solvente. Posteriormente foi liofilizado (Liofilizador LS 3000 Terroni®) sob temperatura de -20°C a -40°C, fornecendo 47g do extrato hidroetanólico liofilizado (EHL).

O EHL foi redissolvido em uma solução de 50 mL de metanol: água (7:3 - v:v) e particionado em um funil de separação (Da Cunha et al., 2013) utilizando-se os seguintes solventes em grau crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e álcool n-butílico. A porção final correspondeu à fase aquosa. Cada fração do extrato foi submetida ao evaporador rotativo a 40°C, com rotação de 70 rpm e ao liofilizador (Liofilizador LS 3000 Terroni®) sob temperatura de -20°C a -40°C, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração. A fração que foi utilizada para os testes de atividade antimicrobiana foi a diclorometano, cujo peso final do pó foi de 6g.

Caracterização Fitoquímica da FDIC de *S. obtusifolium*

Screening qualitativo

A primeira etapa deste estudo foi realizar a investigação fitoquímica da FDIC de *S. obtusifolium*. A presença de saponinas, polissacarídeos, taninos e fenólicos totais, flavonoides, alcaloides, esteróides e triterpenos foi avaliada segundo o método descrito por Matos (2009) e Costa (2010).

Screening quantitativo

Foi realizado um *screening* quantitativo para avaliar o conteúdo de polifenóis totais (Chandra, & De Mejia Gonzalez, 2004), flavonoides totais (Meda et al., 2005) e taninos condensados (Makkar, & Becker, 1993) da FDIC de *S. obtusifolium*. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando um leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader).

Análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H da FDIC de *S. obtusifolium*

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro Bruker Ascend operando a 400 MHz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio (CDCl_3) e o próprio solvente foi usado como referência interna.

Atividade antifúngica

Microrganismos envolvidos no estudo

Foram utilizadas linhagens da American Type Culture Collection (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz/RJ. As cepas clínicas de *C. albicans* (A4, A5 e A6) foram armazenadas em amostras no Laboratório de Patologia, no Departamento de Odontologia da UEPB.

Reativação de microrganismos e preparo do inóculo

As cepas de coleção de referência e as cepas clínicas foram reativadas a partir de sua cultura original em meio ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Paraná, Brasil) e incubadas a 37°C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi, Paraná, Brasil). Em seguida, a concentração celular foi determinada por um espectrofotômetro visível (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) usando um comprimento de onda de 530 nm e absorvância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, essa concentração foi diluída 1000× em caldo Sabouraud Dextrose, obtendo-se finalmente uma concentração de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. Nos poços das microplacas, durante os testes de atividade antimicrobiana, essa concentração caiu pela metade, resultando em $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. (CLSI, 2008).

Determinação da atividade antifúngica

O potencial antimicrobiano da fração foi analisado na presença de espécies isoladas de *Candida* e também em combinação (*C. albicans* + *C. glabrata*) pelo método de microdiluição em caldo, com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima de fungicida (CFM) seguindo as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

A FDIC foi diluída em álcool etílico a 40%, resultando em uma concentração de 4000 µg/mL. Em seguida, 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose foram adicionados aos poços, seguidos por 100 µL da fração aos poços iniciais. Após microdiluição em série, foram obtidas concentrações entre 1000 e 7,8 µg/mL da FDIC. Em seguida, foram adicionados 100 µL de suspensão de levedura. Nistatina e fluconazol foram utilizados como controles positivos (64 a 0,5 µg/mL). Além disso, foram realizados controle do veículo utilizado, do crescimento dos fungos e de esterilidade do meio. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano visível, confirmada pelo corante resazurina.

Para a determinação da CFM, uma alíquota de 10 µL de cada poço com concentrações iguais ou superiores à CIM foi subcultivada em meio de ágar Sabouraud Dextrose e incubada a 37°C por 24 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento visível. Os testes foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se a substância tinha uma atividade fungistática ($CFM / CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM / CIM < 4$) (Siddiqui et al., 2013).

Efeito da FDIC de S. obtusifolium sobre a cinética do crescimento de Candida albicans

A curva *Time kill* foi utilizada para avaliar o tempo mínimo necessário para a morte da cepa de *C. albicans* (ATCC 10231). Em uma placa de microdiluição de fundo chato de 96 poços, foi adicionado 100 µL de meio de cultura (caldo Sabouraud Dextrose) em cada poço, seguido pela fração diclorometano nas concentrações correspondentes à CIM, 2xCIM e 4xCIM (500 µg/mL, 1000 µg/mL e 2000 µg/mL). Finalmente, 100 µL do inóculo de *C. albicans* ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada a 37°C, por 24 h, em atmosfera aeróbica. Alíquotas de 10 µL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose em intervalos de 0 (momento inicial), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do teste. Após esse período, foi contado o número de microrganismos viáveis (UFC/mL) para cada concentração e tempo de análise. A nistatina foi utilizada como controle positivo nas concentrações correspondentes à CIM, 2xCIM e 4xCIM (2 µg/mL, 4 µg/mL e 8 µg/mL). Além

disso, foram realizados o controle do veículo utilizado, crescimento de fungos e esterilidade do meio. (Klepser et al., 1997; Cantón et al., 2009; De Castro et al., 2013). O teste foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes.

Efeito antibiofilme

O efeito antibiofilme da FDIC de *S. obtusifolium* foi avaliado por meio de testes de inibição da adesão fúngica e biofilme maduro, em microplacas de 96 poços. Para estes ensaios, foram utilizadas suspensões individuais ($5,0 \times 10^5$ UFC/mL) de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (ATCC 90030), bem como suspensões mistas desses microrganismos em igual proporção. Para todos os testes foram utilizados controle de crescimento (sem adição de antimicrobianos), controle farmacológico (nistatina), controle de veículo (diluyente de extrato), além de controle de esterilidade do meio de cultura.

Para o teste de inibição da adesão, as microplacas de 96 poços contendo 100 μ L de suspensões de microrganismos foram incubadas (37°C, aerobicamente) com 100 μ L de caldo nutritivo (Sabouraud Dextrose suplementado com sacarose a 4%) e 100 μ L da fração e da nistatina na CIM, 2x CIM e 4x CIM. Após 24 horas, o conteúdo líquido foi removido e o biofilme formado no fundo das placas foi coletado em 200 μ L de suspensão de solução salina.

Para o ensaio de inibição de biofilme maduro, em microplacas de 96 poços foram inseridos 100 μ L de caldo Sabouraud Dextrose suplementado com 4% sacarose e 100 μ L da suspensão de microrganismos. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h, a 37°C, em aerobiose, para o desenvolvimento e maturação desses biofilmes. Após esse período, o meio de cultura das placas foi removido e foram adicionados 100 μ L de caldo nutritivo (Sabouraud Dextrose suplementado com sacarose a 4%) e 100 μ L da fração do extrato e da nistatina nas concentrações de CIM, 2x CIM e 4x CIM. As placas foram incubadas novamente por um período de 24 h, a 37°C, em aerobiose. Após 24 horas, o conteúdo líquido foi removido e o biofilme formado no fundo das placas foi coletado em 200 μ L de suspensão de solução salina (Almeida et al., 2018; Cavalcanti et al., 2016).

Quantificação de células viáveis

A suspensão do biofilme foi submetida a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}). Uma alíquota (10 μ L) de cada diluição foi semeada em meio ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As UFCs foram contadas e os resultados relatados como UFC/mL. O teste foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes (Almeida et al., 2018; Cavalcanti et al., 2016).

Atividade metabólica

A atividade metabólica das células foi determinada usando o método MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] (Sigma-Aldrich - brometo de tiazolil- azul de tetrazólio). Um volume de 180 µL de solução contendo células do biofilme residual foi centrifugado (KASVI, K14-0602) a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de solução de MTT foram adicionados ao sedimento na concentração de 0,5 mg /mL. As células foram incubadas durante três horas a 37°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de isopropanol ácido (95:5 v/v álcool isopropílico: ácido clorídrico) foram adicionados às células. As células foram incubadas novamente a 37°C por 15 minutos. A absorbância foi lida utilizando um leitor de microplacas (Biochrom, EZ Reader 400 Microplate Reader) a um comprimento de onda de 490 nm. O teste foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes (Almeida et al., 2018; Cavalcanti et al., 2016).

Aspectos Éticos

Em respeito à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS/MS), que regulamenta a ética na pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, este estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), registrado na Plataforma Brasil no site do Ministério da Saúde e aprovado com o seguinte CAAE: 16618919.4.0000.5187.

Estatística

Os resultados dos ensaios da ação da FDIC sobre a cinética do crescimento de *C. albicans* e da eficácia antibiofilme foram analisados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS para Windows, versão 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, EUA) com um nível de significância de 5%. O teste de variância a um fator fixo (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey foram empregados para checar diferenças nas variáveis dependentes entre os grupos.

RESULTADOS

Caracterização fitoquímica

Screening qualitativo

Na análise fitoquímica da FDIC de *S. obtusifolium* foi possível identificar a presença de diferentes classes de compostos químicos como saponinas, taninos e fenólicos totais, alcaloides e esteroides/triterpenos. (Tabela 1).

Tabela 1. Análise fitoquímica da fração diclorometano do extrato de folhas de *S. obtusifolium*.

COMPOSTOS FITOQUÍMICOS					
Saponinas	Polissacarídeos	Taninos e Fenólicos totais	Flavonoides	Alcaloides	Esteroides/Triterpenos
+++	-	+++	++	++	+++

(+++) = Fortemente positivo; (++) = moderadamente positivo; (+) Positivo; (-) negativo.

Screening quantitativo

Na Tabela 2 é possível verificar a concentração de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados na FDIC de *S. obtusifolium*.

Tabela 2. Quantificação de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados da fração diclorometano do extrato hidroetanólico de *S. obtusifolium*.

Compostos químicos	mg/g	%
Polifenóis totais	453,63 ± 35,63	45,36 ± 3,56
Flavonoides totais	383,65 ± 70,26	38,36 ± 7,03
Taninos condensados	145,78 ± 10,81	14,58 ± 1,08

*Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (mg de equivalentes do padrão de referência por g da fração diclorometano).

Análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H da FDIC de *S. obtusifolium*

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da FDIC de *S. obtusifolium* mostrou um envelope de sinais entre δ_{H} 2,5 e 0,75 ppm além de multipletos entre δ_{H} 5,33 e 5,10, sugestivos da presença de carbonos metílicos e metilênicos e de hidrogênios oximetínicos (Kojima, Sato, Hatano, & Ogura, 1990). Foram vistos também sinais na região de δ_{H} 4,1 e 3,2 ppm sugestivos da presença de unidade osídica na amostra (Fig.1) (Kasai et al.,1987). A análise desses sinais sugere a presença de núcleos triterpenoides ligados à (s) molécula (s) de açúcar (es) na amostra, indicativos de saponinas.

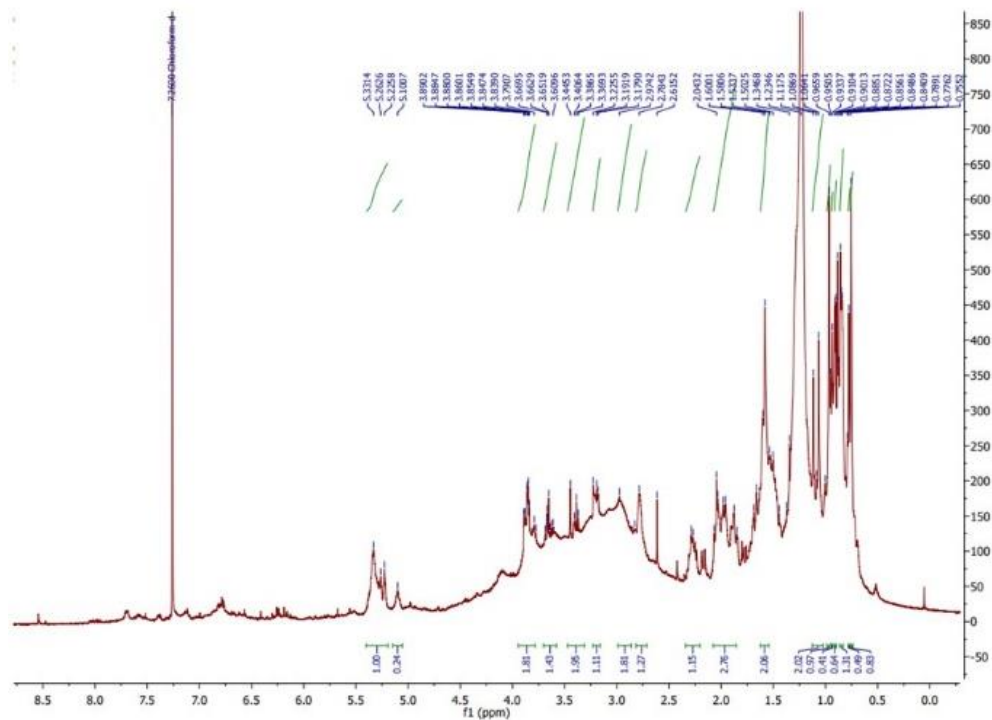


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H da fração diclorometano de *S. obtusifolium* (400 MHz, CDCl_3)

Atividade antifúngica

Determinação da atividade antifúngica

Os valores da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima sobre as cepas de *Candida* estão expressos na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da CIM e da CFM da fração diclorometano de *S. obtusifolium* e controles positivos de acordo com as espécies de *Candida*. Os valores de CIM e CFM foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

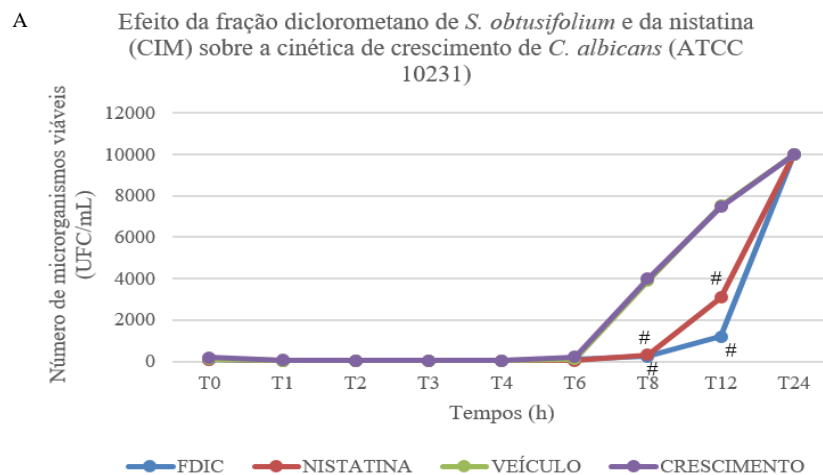
Leveduras	Fração Diclorometano			Nistatina			Fluconazol		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	500	1000	2	2	4	2	>64	>64	>1
<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	250	>1000	>4	1	>64	>64	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231) + <i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	250	>1000	>4	1	32	32	16	>64	>4
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	500	>1000	>2	8	8	1	>64	>64	>1
<i>C. krusei</i> (ATCC 34135)	1000	>1000	>1	8	16	2	>64	>64	>1
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	1000	1000	1	16	>64	>4	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (A4)	500	1000	2	8	16	2	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (A5)	1000	1000	1	8	16	2	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (A6)	1000	>1000	>1	8	16	2	>64	>64	>1

Frente aos resultados pode-se observar que a fração diclorometano de *S. obtusifolium* demonstrou atividade antifúngica sobre o crescimento de espécies de *Candida* spp.,

apresentando valores de CIM que variaram entre 250 µg/mL e 1000 µg/mL para estas espécies. Observa-se que as espécies *C. glabrata* (ATCC 90030) e a associação de *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030) apresentaram maior sensibilidade à ação antifúngica da fração. Pode-se observar também que a fração diclorometano demonstra ação fungistática para maioria das espécies analisadas.

Efeito da FDIC sobre a cinética do crescimento de Candida albicans- Curva Time Kill

A análise do efeito antifúngico da FDIC de *S. obtusifolium* e da nistatina foi avaliada em diferentes concentrações e tempos de ação das substâncias, com o objetivo de investigar seus efeitos sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231). Todas as concentrações da FDIC e da nistatina reduziram a média do número de UFC/mL quando comparadas ao controle de crescimento ($p < 0,05$) (Fig. 2). A FDIC na CIM (500 µg/mL) e 2xCIM (1000 µg/mL) e a nistatina 2xCIM (4 µg/mL) e 4xCIM (8 µg/mL) apresentaram redução semelhante na viabilidade de *C. albicans* até doze horas. Após esse período, as duas substâncias não mantiveram a atividade sobre o crescimento de *C. albicans*. No entanto, a FDIC na concentração de 2000 µg/mL (4xCIM) revelou diminuição contínua e completa sobre o crescimento fúngico até 24 horas ($p < 0,05$) (Fig. 2C).



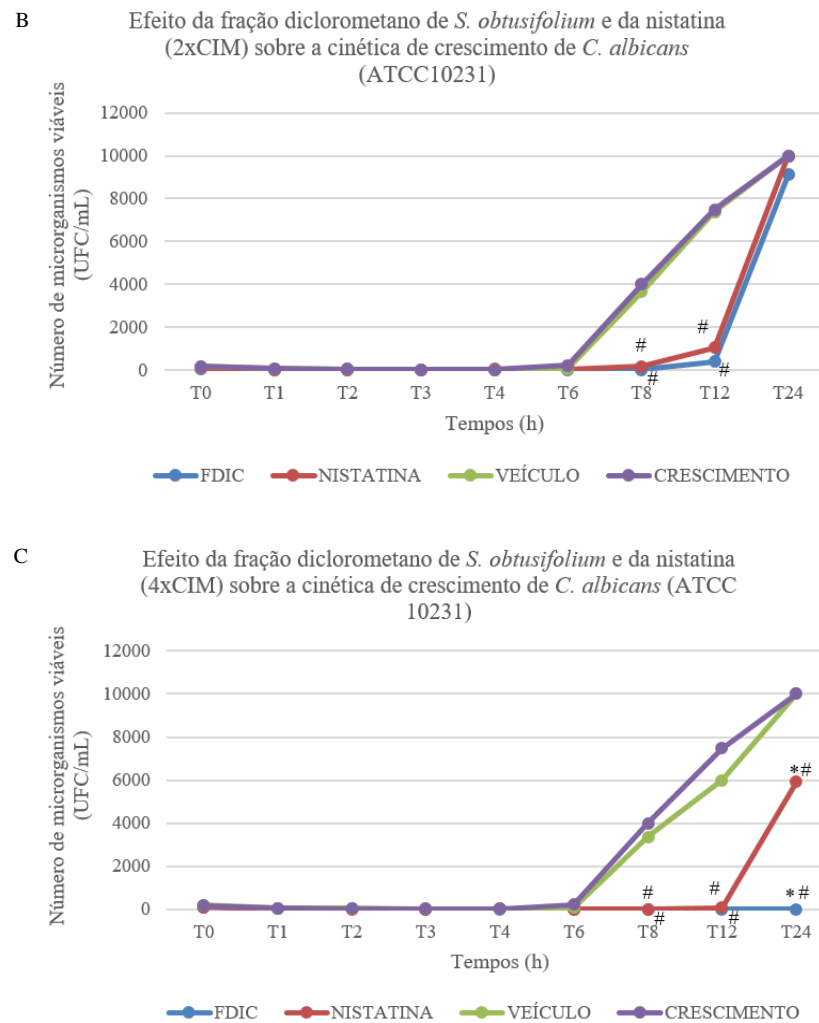


Figura 2. Efeito da fração diclorometano de *S. obtusifolium* e da Nistatina na cinética de crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231) expostas às concentrações (A) CIM, (B) 2xCIM e (C) 4xCIM. Resultados expressos através da média do número de microrganismos (UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação sob exposição à fração e à nistatina.

* Indica diferença significativa entre a fração e a nistatina ($p < 0,05$); # indica diferença significativa entre cada substância e controle de crescimento ($p < 0,05$), de acordo com o teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

Efeito antibiofilme

A concentração referente a 4xCIM (2000 $\mu\text{g/mL}$) da FDIC de *S. obtusifolium* foi a mais eficaz na redução do número de células viáveis e da atividade metabólica sobre a aderência e o biofilme de células de *C. albicans* (ATCC 10231) (Fig.3), porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparada à concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ da FDIC na aderência e com as concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em biofilme (Fig.4). A atividade antiaderente e antibiofilme da FDIC se manteve frente às cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030) associadas, em menor concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$) (Fig.5), sem diferença estatística na atividade antiaderente ($p > 0,05$) quando comparada à concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ da FDIC e entre as concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em biofilme das cepas associadas ($p > 0,05$) (Fig.4). A concentração referente a 4xCIM (4 $\mu\text{g/mL}$)

da nistatina foi a mais eficaz na redução do número de microrganismos viáveis e na atividade metabólica fúngica sobre a aderência e o biofilme de células de *C. glabrata* (ATCC 90030), porém os valores não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$) quando comparados à concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ da FDIC (4xCIM) (Fig.6), que por sua vez, não apresentou diferenças estatísticas significativas com as concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ da FDIC ($p>0,05$) (Fig. 4)

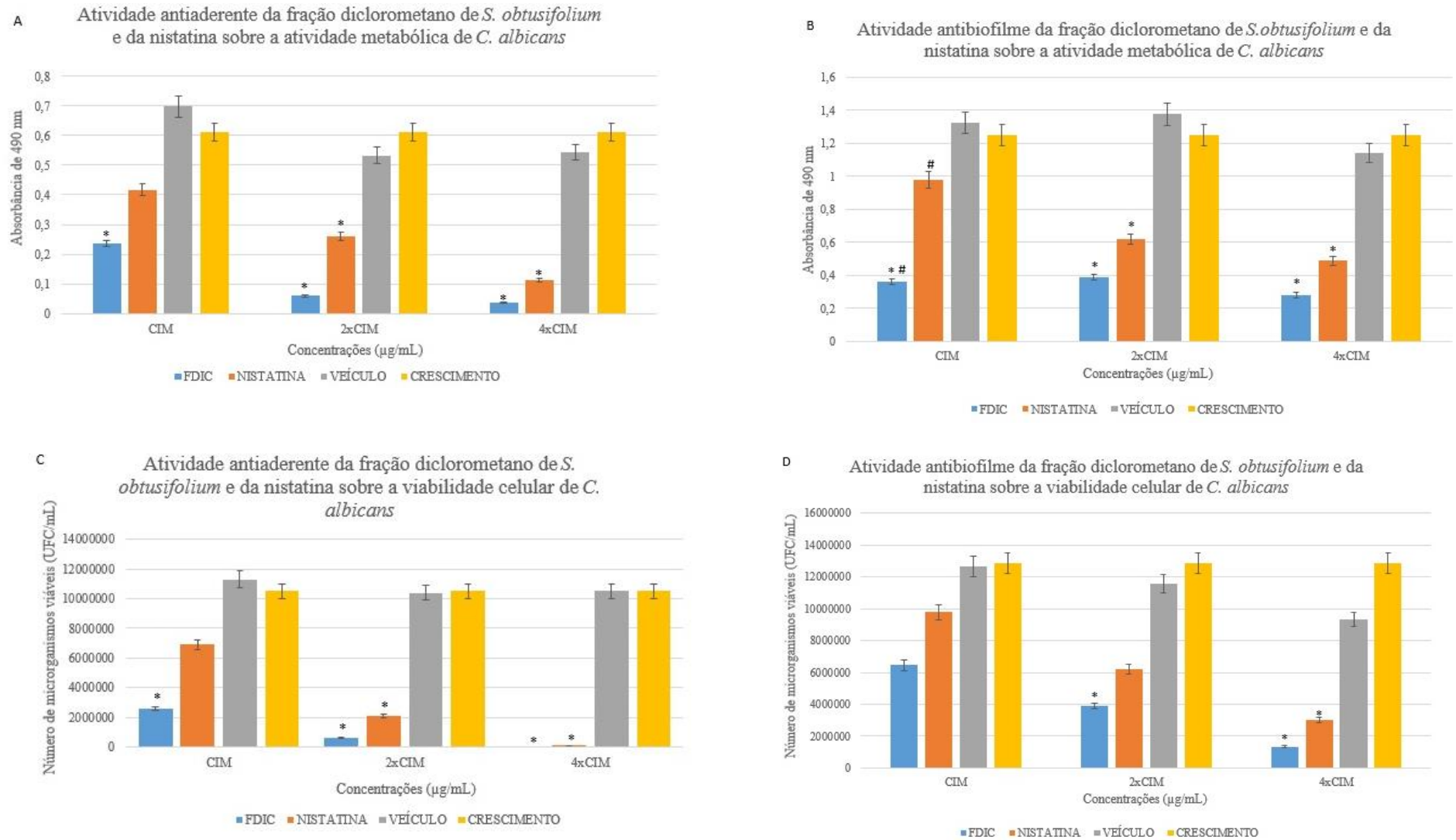


Figura 3. Atividade antiaderente e antibiofilme da fração diclorometano de *S. obtusifolium* e da nistatina sobre a atividade metabólica (A e B) e a viabilidade celular (C e D) de *C. albicans* (ATCC 10231), após 24h de exposição às diferentes concentrações das substâncias. # indica diferença significativa entre a fração e a nistatina ($p < 0,05$); * indica diferença significativa entre cada substância e o controle de crescimento ($p < 0,05$), de acordo com o teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

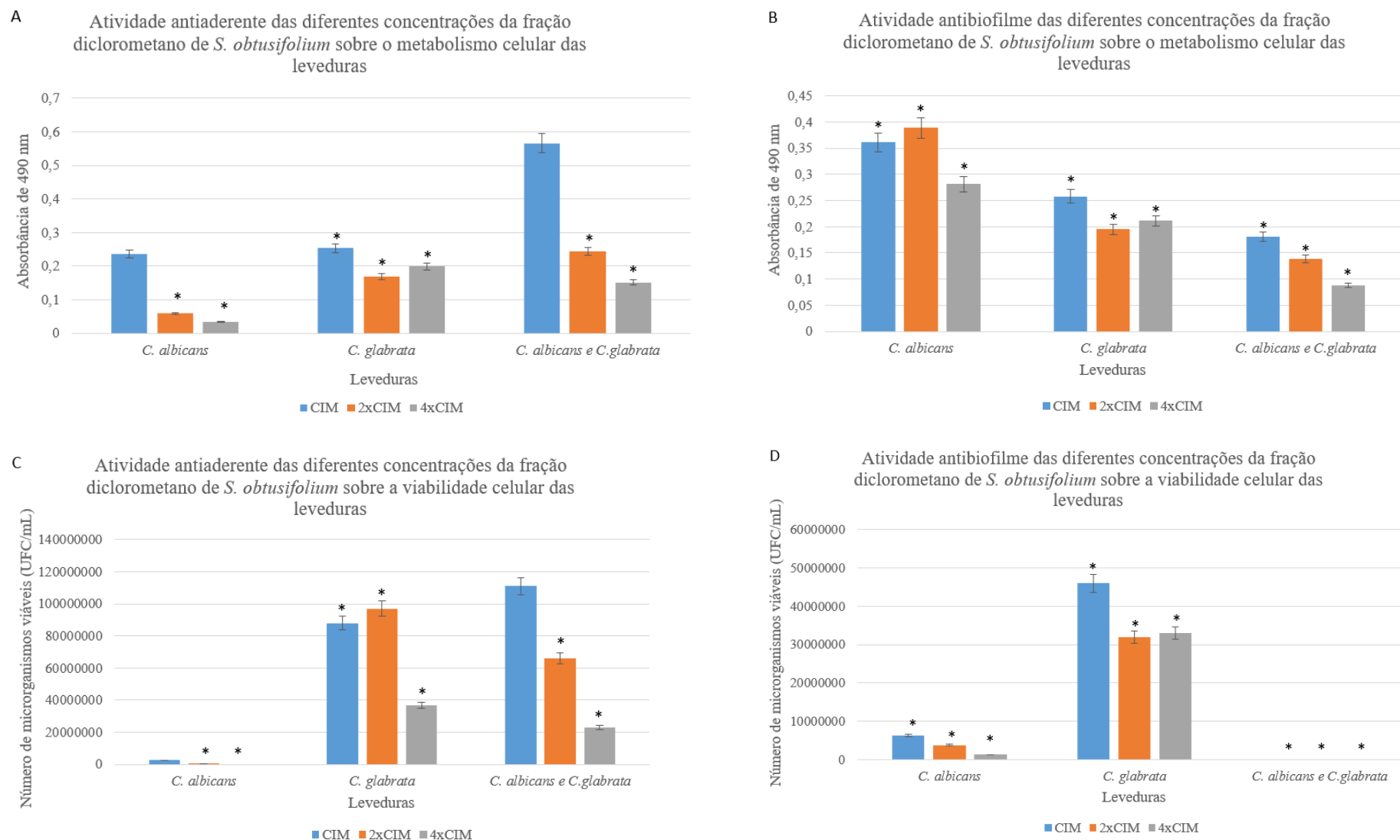


Figura 4. Atividade antiaderente e antibiofilme das diferentes concentrações da fração diclorometano de *S. obtusifolium* sobre a atividade metabólica (A e B) e a viabilidade celular (C e D) das leveduras testadas, após 24h de exposição à fração.

* indica que não houve diferença significativa entre as concentrações da fração ($p > 0,05$), de acordo com o teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

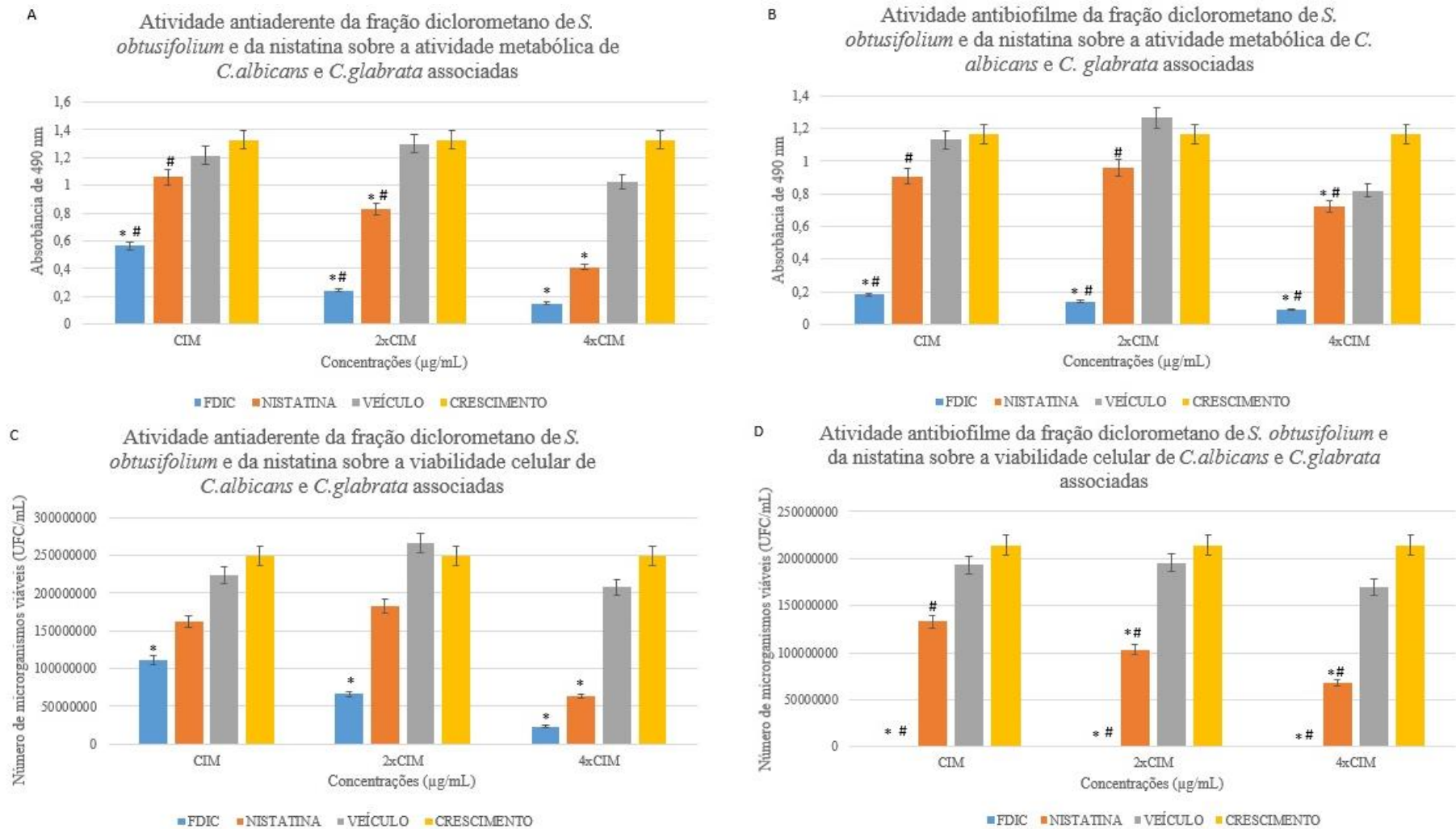


Figura 5. Atividade antiaderente e antibiofilme da fração diclorometano de *S. obtusifolium* e da nistatina sobre a atividade metabólica (A e B) e a viabilidade celular (C e D) em cepas de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (ATCC 90030) associadas, após 24h de exposição às diferentes concentrações das substâncias. # indica diferença significativa entre a fração e a nistatina ($p < 0,05$); * indica diferença significativa entre cada substância e o controle de crescimento ($p < 0,05$), de acordo com o teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

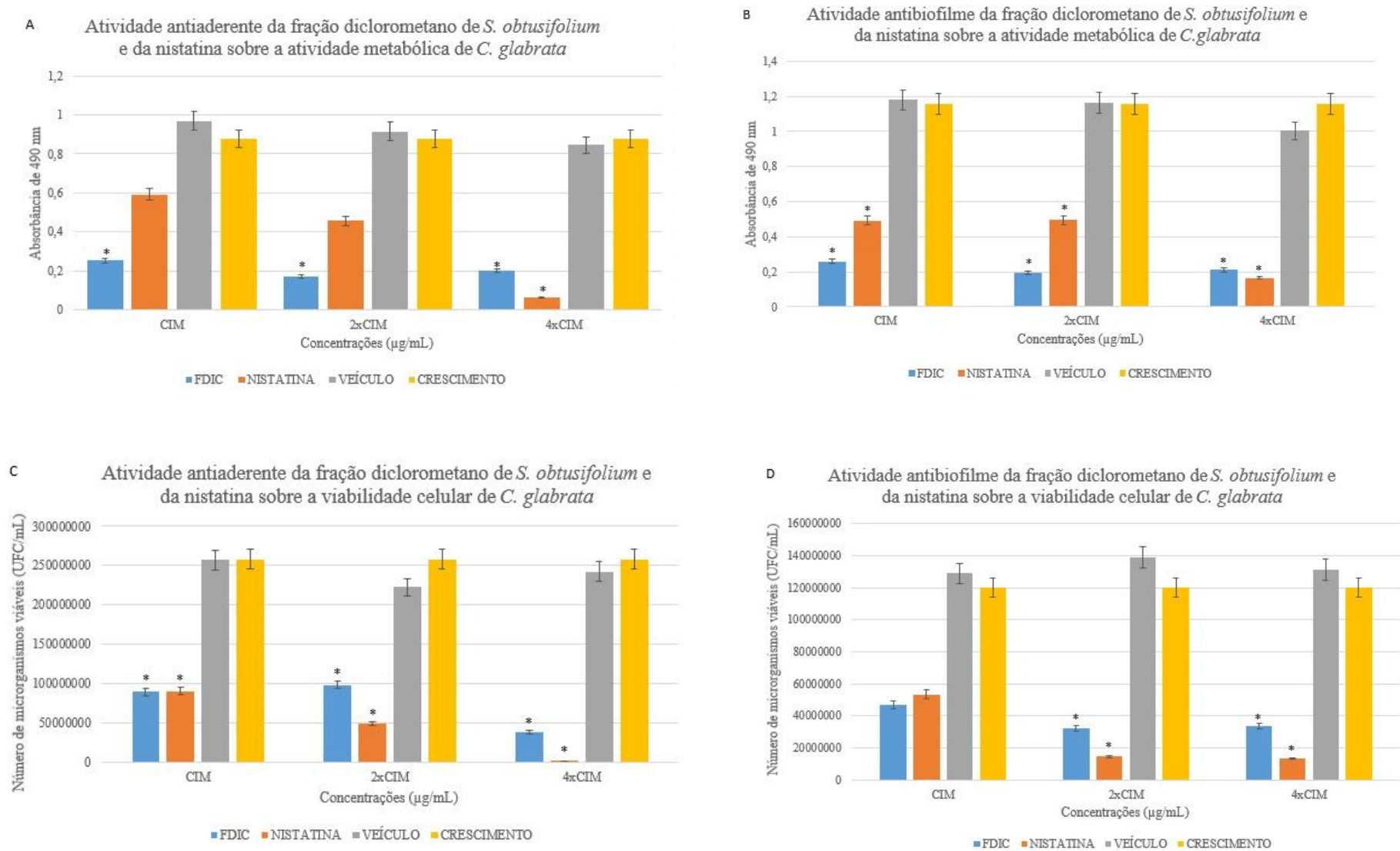


Figura 6. Atividade antiaderente e antibiofilme da fração diclorometano de *S. obtusifolium* e da nistatina sobre a atividade metabólica (A e B) e a viabilidade celular (C e D) de *C. glabrata* (ATCC 90030), após 24h de exposição às diferentes concentrações das substâncias.

indica diferença significativa entre a fração e a nistatina ($p < 0,05$); * indica diferença significativa entre cada substancia e o controle de crescimento ($p < 0,05$), de acordo com o teste ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.

DISCUSSÃO

O tratamento de infecções por *Candida* com antifúngicos padrões está se tornando mais difícil, devido principalmente à resistência emergente aos antimicrobianos. Portanto, é necessário procurar agentes alternativos, seguros e eficazes com pouco ou nenhum efeito adverso (Sharifzadeh, Khosravi, Shokri, & Tari, 2017). Assim, o interesse por terapias complementares vem aumentando ao longo dos anos, encontrando-se em expansão o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (Monteiro, & Fraga, 2015).

Os estudos fitoquímicos são a base para o *design* e desenvolvimento de novas drogas sintéticas. Dessa forma estudos *in vitro* são normalmente a primeira escolha para avaliar as propriedades curativas dos compostos naturais (Martins et al., 2015).

O cerrado brasileiro, pela sua diversidade biológica abrigando cerca de 25% da flora mundial, tem sido usado como fonte de matéria prima para o desenvolvimento de medicamentos e fitoterápicos (Cartaxo-Furtado et al., 2017). Diante disto, este estudo analisou o perfil fitoquímico e a atividade antifúngica da fração diclorometano de *S. obtusifolium*, que é uma planta típica da região semiárida da caatinga do Nordeste brasileiro.

Muitas plantas são frequentemente usadas por populações locais como terapia para várias doenças sem que seus compostos ativos sejam estudados e identificados para validá-los como medicamentos e impulsioná-los economicamente (Alves, & Nascimento, 2010). *S. obtusifolium* é utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas afecções como inflamações ovarianas, diabetes, gripe, gastrite, úlceras, azia, problemas cardíacos (Araújo-Neto et al., 2010; Leite et al., 2015; Aquino et al., 2016), fato este que justifica que se faça uma investigação dos fitoconstituintes presentes nesse vegetal.

A pesquisa por fitoconstituintes de uma espécie vegetal se inicia com o fracionamento de extratos vegetais e avaliação de suas atividades biológicas (Simões et al., 2004). Alguns extratos vegetais fracionados apresentam importante atividade sobre isolados clínicos de *C. albicans*, bem como ação inibitória sobre a atividade proteolítica da membrana fúngica (Höfling et al., 2011).

A prospecção fitoquímica da fração diclorometano de *S. obtusifolium*, revelou a presença de diversas classes de metabólitos secundários, dentre eles saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides e terpenoides (Tabela 1). Esse resultado corrobora com os estudos realizados por Araújo-Neto et al. (2010), Passos-Oliveira et al. (2012), Leite et al. (2015), Aquino et al. (2016) e Sampaio et al. (2017).

O *screening* quantitativo revelou uma grande concentração de polifenóis totais, seguidos de flavonoides totais e em menor quantidade de taninos, estando de acordo aos achados na investigação qualitativa realizada no presente estudo. Esses compostos fitoquímicos foram também mencionados nos estudos de Sampaio et al. (2017), Aquino et al. (2016) e Pereira et al. (2016), porém em proporções diferentes. A idade e o desenvolvimento da planta, bem como as diferentes partes do vegetal utilizadas nas pesquisas podem influenciar na quantidade total de metabólitos produzidos (Gobbo-Neto, & Lopes, 2007). Além disso, a sazonalidade, tipo de solo, temperatura, e o clima também podem ter influência sobre o potencial dos constituintes bioativos das espécies vegetais (Gobbo-Neto, & Lopes, 2007; Lubian et al., 2010).

O espectro de RMN de ^1H sugeriu a presença de estruturas terpênicas. A associação desse achado com a presença sugestiva de unidades osídicas na amostra indica a possibilidade da existência de saponinas que são esteroides ou triterpenos ligados a açúcares amplamente distribuídos em espécies vegetais com notáveis atividades antimicrobianas (Hassan et al., 2010; Lanzotti et al., 2012; Rahman et al., 2017). Os dados encontrados nesta análise corroboram com os dados do *screening* qualitativo apresentados na Tabela 1.

Evidências disponíveis na literatura associam a presença de compostos fitoquímicos às atividades biológicas, inclusive antifúngicas. Estudos realizados mostram que os terpenos são capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* (Komaki et al., 2008; Shih et al., 2013; Favre-Godal et al., 2015), além disso apresentam efeitos antifúngicos *in vitro* contra isolados de *Candida* spp. resistentes ou não ao fluconazol (Ahmad et al., 2011) e possuem propriedades antibiofilme (Dalleau et al., 2008; Raut et al., 2013; De Vasconcelos et al., 2014). Ademais, estudos afirmam que as saponinas triterpênicas são metabólitos secundários que tem ação anti-*Candida* contra *C. albicans* (Sajjadi, Saboora, & Mohammadi, 2016; Soberón et al., 2017) *C. krusei* e *C. tropicalis* (Sajjadi, Saboora, & Mohammadi, 2016).

A literatura também revela que compostos fenólicos apresentam atividade anti-*Candida* (Cartaxo-Furtado et al., 2015; Sampaio et al., 2017). Estudos afirmam que os flavonoides possuem atividade antibacteriana e antiviral, apresentando também efeitos antifúngicos com ação sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Kang, Fong, & Tsang, 2010; Ozelik, Kartal, & Orhan, 2011; Kvasnickova et al., 2015; Yun et al., 2015). Também são citadas na literatura atividades antibiofilmes *in vitro* sobre *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Cao et al., 2008; Kvasnickova et al., 2015). Adicionalmente, há relatos na literatura de atividade antifúngica dos taninos (Cartaxo-Furtado et al., 2015; Sampaio et al., 2017).

Na perspectiva de estudos de bioprospecção, há a necessidade de analisar a ação antimicrobiana dos extratos vegetais. Esse estudo investigou a atividade antifúngica da fração diclorometano de *S. obtusifolium* frente a diferentes espécies de leveduras. Essa atividade necessita ser classificada com base no nível de inibição microbiana a partir dos valores da CIM (Aligiannis et al., 2001; Holetz et al., 2002; Sartoratto et al., 2004; Morales et al., 2008).

Diante disso, pode-se afirmar que segundo Aligiannis et al. (2001) a fração diclorometano de *S. obtusifolium* apresentou forte atividade antifúngica frente a todos os microrganismos testados por ter demonstrado valores de CIM ≤ 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Porém a literatura não é unânime quanto à classificação baseada nos valores de CIM. Para Holetz et al. (2002) e Morales et al. (2008), a FDIC apresenta atividade antifúngica de moderada (CIM entre 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$) a fraca (CIM entre 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$), tendo demonstrado potencial antimicrobiano moderado contra *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030) associadas e em isolado clínico de *C. albicans* (A4), enquanto que para *C. krusei* (ATCC 34135), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e isolados clínicos de *C. albicans* (A5 e A6), mostra fraca atividade antifúngica.

De acordo com a classificação de Sartoratto et al. (2004) a FDIC apresenta forte atividade antifúngica (CIM entre 50 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$) sobre *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030) associadas e isolado clínico de *C. albicans* (A4) e atividade moderada (CIM entre 600 $\mu\text{g/mL}$ e 1500 $\mu\text{g/mL}$) contra *C. krusei* (ATCC 34135), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e isolados clínicos de *C. albicans* (A5 e A6).

Assim pode-se afirmar que, independente das divergências entre as classificações de acordo com os valores de CIM, a fração diclorometano de *S. obtusifolium* apresentou atividade antifúngica sobre as espécies fúngicas testadas. Esse resultado está de acordo com os estudos de Sampaio et al. (2017) e Pereira et al. (2016) que confirmam a atividade antimicrobiana da FDIC contra *C. albicans*, porém com valores de CIM diferentes do encontrado neste estudo (250 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Diferenças regionais quanto a época e o local da colheita da planta (Reis et al., 2011) assim como a proporção de substâncias químicas presentes podem ocasionar diferenças na CIM e CFM entre os estudos (De Almeida et al., 2016).

Os resultados da atividade antimicrobiana da fração foram significativos visto que *C. albicans* é o fungo oportunista mais difundido dentro do corpo humano, sendo o principal patógeno causador da candidose oral (Pereira et al., 2016). Porém, outras espécies importantes

de *Candida* também são encontradas no organismo, incluindo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Estivill et al., 2011). Em um estudo sobre a epidemiologia da candidose invasiva, Pfaller e Diekema (2007) observaram que *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* representaram coletivamente cerca de 95% das infecções identificáveis por *Candida*. Outros estudos revelam que a maioria dos casos de fungemia foi significativamente associado às espécies não-*albicans* (Chakrabarti et al., 2009; Pfaller et al., 2010).

Das espécies fúngicas testadas, a *C. glabrata* foi a que apresentou maior sensibilidade à ação da FDIC, o que torna esse achado promissor visto que a redução da suscetibilidade de *C. glabrata* aos azóis pode ser um problema para o tratamento de infecções causadas por esta espécie (Pemán et al., 2012; Arendrup et al., 2013; Quindós, 2014; Miranda-Cadena et al., 2018). Além disso, após o uso disseminado de agentes imunossupressores e tratamento com antibióticos de amplo espectro, o número de infecções sistêmicas e mucosas causadas por *C. glabrata* aumentou consideravelmente (Silva et al., 2012; Bakhtiari et al., 2019).

A análise do potencial antifúngico da fração diclorometano possibilitou sua classificação com base na relação CFM/CIM proposta por Siddiqui et al. (2013), tendo mostrado ação fungistática para a maioria das espécies estudadas. Esse fato pode ser favorável no controle de infecção sem causar um desequilíbrio na microbiota oral normal, que ocorre geralmente com substâncias fungicidas (Almeida et al., 2018). Além disso, Marsh (2010) afirma que o sucesso da terapia antifúngica requer manutenção do biofilme em níveis consistentes com a saúde oral. Porém, segundo a tabela 3, a FDIC apresentou atividade fungicida frente a *C. albicans* (ATCC 10231) como também em isolado clínico dessa espécie (A4), estando de acordo com o estudo de Sampaio et al. (2017) que analisando o potencial antifúngico da FDIC em cepa de coleção de referência de *C. albicans*, afirmam que apresenta potencial fungicida, com melhores resultados do que o extrato bruto de *S. obtusifolium*.

Os achados desse estudo em relação à atividade antifúngica frente aos isolados clínicos de pacientes imunodeprimidos são de extrema importância visto que a colonização patológica de espécies de *Candida* está relacionada a vários fatores que incluem, dentre outros, as condições imunodeprimidas (Kong et al., 2015; Pereira et al., 2016; Hellstein, & Marek, 2019). Além disso, os microrganismos obtidos através de isolados clínicos apresentam maior resistência aos antifúngicos (Costa et al., 2009).

Adicionalmente, o efeito da fração diclorometano de folhas de *S. obtusifolium* em diferentes concentrações e intervalos de tempos permite esclarecer as condições mais favoráveis em que a fração exerceu seu efeito antifúngico (Klepser et al., 1997; Cantón et al., 2009; De Castro et al., 2013).

O cumprimento do correto intervalo de tempo entre administrações sucessivas de um antimicrobiano representa um dos fatores fundamentais para se evitar resistência antimicrobiana (Andes et al., 2006). Não há na literatura investigações acerca desse tipo de análise envolvendo *S. obtusifolium*, o que torna este estudo pioneiro nesse aspecto, permitindo estimar o intervalo de tempo no qual a FDIC é capaz de exercer atividade antifúngica, sugerindo um indicativo de uma posologia. Assim, este estudo sugere que a fração na concentração de 4xCIM (2000 µg/mL) apresentou atividade fungicida por 24 h frente ao crescimento de células de *C. albicans*. Além disso, tanto a nistatina (4 µg/mL e 8 µg/mL) quanto a fração (500 µg/mL e 1000 µg/mL) apresentam reduções do crescimento fúngicos semelhantes por um período de 12 h.

A habilidade de formar biofilmes é um dos maiores fatores de virulência da *C. albicans* (Teodoro et al., 2018), pois confere tolerância significativa à terapia antifúngica, principalmente limitando a penetração de substâncias através da matriz extracelular e resistência a ataques de células fagocíticas (Souza et al., 2018). O presente estudo avaliou a capacidade da fração diclorometano de *S. obtusifolium* para inibir a adesão e o biofilme maduro de fungos.

A fração na concentração de 2000 µg/mL e 1000 µg/mL reduziu significativamente a adesão e o biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* respectivamente, com efeitos inibitórios semelhantes em biofilme com as menores concentrações testadas da fração (500 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente). A redução no metabolismo sobre a aderência e o biofilme das células tratadas com a fração diclorometano do extrato de *S. obtusifolium*, como demonstrado pelo teste com MTT, pode estar relacionada à redução no número de células viáveis dos microrganismos (Basso et al., 2011; Almeida et al., 2018) geralmente apresentando perfis proporcionais (Almeida et al., 2018). A melhor atividade antimicrobiana da fração do extrato nas maiores concentrações pode ser consequência da ação antifúngica, com a desagregação das células e inibição da habilidade de adesão. Por sua vez, a redução da atividade metabólica pode ter ocorrido devido ao estresse intracelular promovido pela ação da fração quando em concentração mais alta (Basso et al., 2011).

Neste contexto, o presente estudo apresentou dados significativos, visto que os valores referentes às concentrações em 4xCIM (2000 µg/mL e 1000 µg/mL) foram eficazes na redução do metabolismo e viabilidade celular sobre biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e da associação entre as duas espécies fúngicas. Segundo Souza et al. (2018), concentrações inibitórias mínimas em biofilme de células de *Candida* spp pode ser até 1000 vezes maior do que o valor encontrado para células planctônicas.

Neste ensaio, a nistatina inibiu a adesão e o biofilme celular de *C. albicans* em menores proporções. Este resultado pode ser explicado pelo fato da nistatina ter boa atividade antibiofilme, porém em maiores concentrações (Pierce et al., 2013), diferentes das utilizadas neste estudo. Apesar disso, a nistatina reduziu significativamente a aderência e o biofilme de *C. glabrata*, na concentração de 4 µg/mL, sendo a substância que melhor apresentou atividade antifúngica sobre essa espécie.

Estudos demonstram que a associação da *C. albicans* com *C. glabrata* foi a mais prevalente em pacientes com HIV/Aids (Clarck-Ordóñez, Callejas-Negrete, Aréchiga-Carvajal, & Mouriño-Pérez, 2016) ou naqueles que apresentavam estomatite protética (Muadcheingka, & Tantivitayakul, 2015). Assim, este estudo analisou a atividade antiaderente e antibiofilme da fração sobre a associação das duas cepas mencionadas.

O presente estudo revelou que *C. albicans* ao interagir com *C. glabrata* mostrou maior sensibilidade à ação da fração sobre o biofilme, visto que esta apresentou maior inibição do metabolismo celular além de ter reduzido o número de UFC em 100% já na menor concentração testada (250 µg/mL). Nesse contexto, alguns estudos foram desenvolvidos para entender os mecanismos de interação entre as espécies de *Candida*. Rossoni et al. (2015) afirmam que a redução de UFC/mL de *C. albicans*/mL em biofilmes mistos pode ser atribuída a interações competitivas entre as espécies de *Candida* por locais de adesão durante a fase inicial da formação do biofilme o que atenua a patogenicidade de *C. albicans* em modelos animais.

De Barros et al. (2017) observaram que *C. glabrata* inibe a expressão do gene HWP1 em filamentos de *C. albicans*. Esse gene é responsável por codificar proteínas envolvidas nos fatores de virulência de *C. albicans*, incluindo a formação da parede celular, sinalização intracelular e desenvolvimento de hifas. Além disso, o gene promove a ligação de *Candida* a células epiteliais, como etapa inicial da colonização (Naglik et al., 2006; Biswas, Van Dijck, & Datta, 2007; Chaffin, 2008;).

A inibição da adesão de células de levedura pode ser um alvo para romper os estágios iniciais da formação de biofilme em *Candida* spp. (Rane, Bernardo, Howell, & Lee, 2013). No entanto, a inibição do biofilme de *C. albicans* e *C. albicans* + *C. glabrata* associadas não se correlacionou com o comprometimento da adesão, visto que a fração embora tenha tido um efeito significativo sobre a aderência das células, apresentou maior potencial inibitório sobre o biofilme quando usada a menor concentração (500 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente). Esse fato sugere que possivelmente, embora a adesão seja um fator importante, não significa que seja um evento crucial para a formação de biofilme quando as células de *C. albicans* e das cepas associadas (*C. albicans* + *C. glabrata*) foram expostas à fração do extrato.

Provavelmente, os metabólitos secundários presentes na fração diclorometano de *S. obtusifolium* são os responsáveis pela atividade antiaderente e antibiofilme da fração. Pereira et al. (2016) afirmam que os compostos bioativos encontrados nas folhas de *S. obtusifolium* se ligam ao ergosterol da membrana fúngica, resultando na formação de poros, desencadeando o desequilíbrio iônico celular e a perda da integridade da membrana com consequente lise celular de *C. albicans*.

Estudos com *S. obtusifolium* são escassos. Assim, não há na literatura trabalhos realizados que testem a atividade antifúngica da fração diclorometano em espécies não-*albicans*. Ademais, este trabalho é precursor em relação a atividade antiaderente e antibiofilme da fração, o que torna este estudo relevante para posteriores análises, já que a fração diclorometano apresentou significativa atividade antimicrobiana em espécies *albicans* e não-*albicans*, com importante ação antiaderente e antibiofilme em *C. albicans*, *C. glabrata* e na associação das duas espécies fúngicas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fração diclorometano de *S. obtusifolium* apresentou atividade antifúngica, reduzindo a aderência e o biofilme de espécies de *Candida* spp. Além disso, a fração apresentou atividade fungistática sobre a maioria das espécies avaliadas, porém com efeito fungicida em *Candida albicans* por um período de vinte e quatro horas. Esses efeitos podem ser atribuídos aos metabólitos secundários encontrados na fração, como saponinas e compostos fenólicos. Diante desses resultados, há a necessidade da realização de mais análises como testes de toxicidade e de atividade antioxidante com a FDIC, visando uma possível utilização clínica da mesma como terapia antifúngica alternativa na Odontologia.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não declaram nenhum conflito de interesse.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) através de auxílio financeiro que tornou viável a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., et al. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 30,41–50.
- Aliagiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I.B. (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4168-4170.
- Almeida, C.M., Lima, R.F., Costa, T.K.V.L., Sousa, I.M.O., Cabral, E.C., Basting, R.T., et al. (2018). Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. *Brazilian Oral Research*, 32, e41.
- Alves, J.J, & Nascimento, S.S. (2010). Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri paraibano. *Revista Geográfica Acadêmica*, 4, 73-85.
- Andes, D., Forrest, A., Lepak, A., Nett, J., Marchillo, K., & Lincoln, L. (2006). Impact of antimicrobial dosing regime non evolution of drug resistance *in vivo*: fluconazole and *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2374-2383.
- Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014. Available from: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Accessed june14,2020.
- Aquino, P., Gomes Figueredo, F., Pereira, N., Nascimento, E., Martin, A., Veras, H., et al. (2016). Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. *Acta Biológica Colombiana*, 21, 131-140.
- Araújo-Neto, V., Bomfim, R.R., Oliveira, V.O.B., Passos, A.M.P.R., Oliveira, J.P.R., Lima, C.A., et al. (2010). Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb.ex. Roem. & Schult) T.D.Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20,933-938.
- Arendrup, M. C., Dzajic, E., Jensen, R. H., Johansen, H. K., Kjaeldgaard, P., Knudsen, J.D., et al. (2013). Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: Data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, 343–353.
- Bakhshi, M., Taheri, J-B, Shabestari, S.B., Tanik, A., & Pahlevan, R. (2012). Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. *Gerodontology*, 29, e680-4. <https://doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00544.x>.
- Bakhtiari, S., Jafari, S., Taheri, J.B., Kashi, T.S.J., Namazi, Z., Iman, M., & Poorberafeyi, M. (2019). The Effects of Cinnamaldehyde (Cinnamon Derivatives) and Nystatin on *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7, 1067-1070.
- Basso, F.G., Oliveira, C.F., Fontana, A., Kurachi, C., Bagnato, V.S., Spolidório, D.M. et al. (2011). *In Vitro* effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Brazilian Dental Journal*, 22, 502-510.

- Biswas, S., Van Dijck, P., & Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 71, 348–376. doi:10.1128/MMBR.00009-06.
- Cantón, E., Pemán, J., Valentín, A., Espinel-Ingroff, A., & Gobernado, M. (2009). *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53, 3108–3111.
- Cao, Y., Dai, B., Wang, Y., Huang, S., Xu, Y., Cao, Y., et al. (2008). *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 73–77.
- Cartaxo-furtado, N.A.D.E.O., Sampaio, T.O., Xavier, M.A., Medeiros, A.D.D.E., & Pereira, J.V. (2015). Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17, 1091-1096.
- Cartaxo-Furtado, N.A.O., de Castilho, A.R.F., Freires, I.A., Santana, C.P., Sampaio, T.O., Xavier, M.A. et al. (2017). Physicochemical characterization of a new raw material obtained from leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeel (Myrtaceae). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 127, 1137–1141. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5483-x>
- Cavalcanti, Y.W., Wilson, M., Lewis, M., Del-Bel-Cury, A.A., Silva, W.J., & Williams, D.W. (2016). Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling*, 32, 123-134.
- Chaffin, W.L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 72, 495–544. doi:10.1128/mmbr.00032-07
- Chakrabarti, A., Chatterjee, S.S., Rao, K.L.N., Zameer, M.M., Shivaprakash, M.R., Singhi, S., et al. (2009). Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, 41, 275–284.
- Chandra, S., & De Mejia Gonzalez, E. (2004). Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583-3589.
- Clarck-Ordóñez, I., Callejas-Negrete, O.A., Aréchiga-Carvajal, E.T., & Mouriño-Pérez, R.R. (2016). *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. *Medical Mycology*, 00, 1-10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A3. 3rd ed. Wayne (PA): CLSI; 2008.
- Costa, A.C.B.P., Pereira, C.A., Freire, F., Junqueira, J.C., & Jorge, A.O.C. (2009). Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn.

sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. *Revista de odontologia da UNESP*, 38, 111-116.

Costa, R.S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. 2010. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

Da Cunha, M.G., Franchin, M., Galvão, L.C.C., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Ikegaki, M., et al. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23.

Dalleau, S., Cateau, E., Berges, T., Berjeaud, J.M., & Imbert, C. (2008). *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31,572–576.

De Almeida, L.F.D., de Paula, J.F., de Almeida, R.V.D., Williams, D.W. Josimeri Hebling, J., & Cavalcanti, Y.W. (2016). Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74,393–398.

De Aquino, P.E.A., de Souza, T.F.G., Santos, F.A., Viana, A.F.S.C., Louchard, B.O., Leal, L.K.A.M., et al. (2019). The Wound Healing Property of N-Methyl-(2S,4R) -trans-4-Hydroxy-L-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* is Related to its Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 24, p.1-11.

De Aquino, P.E.A., Magalhães, T.R., Nicolau, L.A.D., Leal, L.K.A.M., de Aquino, N.C., dos Santos, S.M., et al. (2017). The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S,4R) - trans -4-hydroxy- 1 -proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. *Phytomedicine*, 24, 14–23.

De Barros, P.P., Freire, F., Rossoni, R.D., Junqueira, J.C., & Jorge, A.O.C. (2017). *Candida krusei* and *Candida glabrata* reduce the filamentation of *Candida albicans* by downregulating expression of HWP1 gene. *Folia Microbiológica*, 62, 317–323.

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

De Vasconcelos, L.C., Sampaio, F.C., Albuquerque, A. J., & Vasconcelos, L.C. (2014). Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. *Brazilian Dental Journal*, 25, 277–281.

Eller, S.C.W.S., Feitosa, V.A., Arruda, T.A., Antunes, R.M.P., & Catão, R.M.R. (2015). Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 36, 131-136.

Estivill, D., Arias, A., Torres-Lana, A., Carrillo-Muñoz, A.J., Arévalo, M.P. (2011). Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 238-242.

- Favre-Godal, Q., Dorsaz, S., Queiroz, E.F., Marcourt, L., Ebrahimi, S.N., Allard, P.M., & Sanglard, D. (2015). Anti-*Candida* Cassane-Type Diterpenoids from the Root Bark of *Swartzia simplex*. *Journal of Natural Products*, 78, 2994–3004.
- Ferreira, G.L., Pérez, A.L., Rocha, Í.M., Pinheiro, M.A., Castro, R.D., Carlo, H.L., et al. (2015). Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015,147804. <https://doi.org/10.1155/2015/147804>
- Figueiredo, F.J., & Lima, V.L.A.G. (2015). Antioxidant activity of anthocyanins from quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*) fruits. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17, 473-479.
- Girardot, M., & Imber, C. (2016) Novel strategies against *Candida* biofilms: interest of synthetic compounds. *Future microbiology*, 11, 69-79.
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N.P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30, 374-381.
- Gomes, R., Pinheiro, M.C.B., Lima, H.A., Santiago-Fernandes, L.D.R. (2010). Biologia floral de *Manilkara subsericea* e de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) em restinga. *Revista Brasileira de Botânica*, 33, 271-283.
- Hassan, S.M., Haq, A.U., Byrd, J.A., Berhow, M.A., Cartwright, A.L., & Bailey, C.A. (2010). Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry*, 119, 600–605.
- Hellstein, J.W., & Marek, C.L. (2019). Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head and Neck Pathology*, 13,25-32.
- Höfling, J.F., Mardegan, R.C., Anibal, P.C., Furletti, V.F, & Foglio, M.A. (2011). Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*, 172,117-124.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., & Filho, B.P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97,1027-1031.
- Kang, K., Fong, W.P., & Tsang, P.W. (2010). Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. *Mycopathologia*, 170, 391–396.
- Kasai, R., Matsomoto, K., Nie, R.L., Morita, T., Awazu, A., Zhou, A. et al. (1987). Sweet and bitter cucurbitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*. *Phytochemistry*, 26,1371-1376.
- Klepser, M.E., Wolfe, E.J., Jones, R.N., Nightingale, C.H., & Pfaller, M.A. (1997). Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41, 1392–1395.
- Kojima, H., Sato, N., Hatano, A., Ogura, H. (1990). Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29,2351-2355.

- Komaki, N., Watanabe, T., Ogasawara, A., Sato, N., Mikami, T., & Matsumoto, T. (2008). Antifungal mechanism of hinokitiol against *Candida albicans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 735–737.
- Kong, E.F., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Peters, B.M., Shirliff, M.E., Jabra-Rizk, M.A. (2015). Clinical implications of oral candidiasis: host tissue damage and disseminated bacterial disease. *Infection and Immunity*, 83, 604-613.
- Kvasnickova, E., Matatkova, O., Cejkova, A., & Masak, J. (2015). Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. *Journal of Microbiological Methods*, 118, 106–112.
- Lanzotti, V., Romano, A., Lanzuise, S., Bonanomi, G., & Scala, F. (2012). Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. *Phytochemistry*, 74, 133–139.
- Leite, N.S., Lima, A.P., Araújo-Neto, V., Estevam, C. S., Pantaleão, S.M., Camargo, E.A. et al. (2015). Avaliação das atividades cicatrizantes, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17, 164-170.
- Li, Y., Sun, L., Lu, C., Gong, Y., Li, M., Sun, S. (2018). Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 286. doi: 10.3389/fcimb.2018.00286.
- Lubian, C.T., Teixeira, J.M., Lund, R.G., Nascente, P.S., & Del Pino, F.A. (2010). Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12, 157-162.
- Lyu, X., Zhao, C., Yan, Z, Hua, H. (2016). Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1161–1171.
- Makkar, H.P., & Becker, K. (1993). Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 613-621.
- Marsh, P.D. (2010). Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry*, 38, S11-S15.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). *In Vivo* Anti-*Candida* Activity of Phenolic Extracts and Compounds: Future Perspectives Focusing on Effective Clinical Interventions. *BioMed Research International*, 2015, 247382. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/247382>.
- Matos, F.J.A. (2009). *Introdução à fitoquímica experimental*. (3 ed.). Fortaleza: Edições UFC.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogoc, J., Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-577.

- Miranda-Cadena, K., Marcos-Arias, C., Mateo, E., Aguirre, J.M., Quindós, G., & Eraso, E. (2018). Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. *Archives of Oral Biology*, 95,100–107.
- Monteiro, M.H.D.A., & Fraga, S.A.P.M. (2015). Fitoterapia na odontologia: levantamento dos principais produtos de origem vegetal para saúde bucal. *Revista Fitos*, 9, 265-268.
- Morales, G., Paredes, A., Sierra, P., & Loyola, L.A. (2008). Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*, 13,790-794.
- Muadcheingka, T., & Tantivitayakul, P. (2015). Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology*, 60,894-901.
- Naglik, J.R., Fostira, F., Ruprai, J., Staab, J.F., Challacombe, S.J., & Sundstrom, P. (2006). *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1323–1327.
- Ozcelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49,396–402
- Passos oliveira, A., Raith, M., Kuster, R.M., Rocha, L.M., Hamburger, M., & Potterat, O. (2012). Metabolite Profiling of the Leaves of the Brazilian Folk Medicine *Sideroxylon obtusifolium*. *Planta Medica*, 78, 703-710.
- Patil, S., Rao, R.S., Majumdar, B., Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*,6,1391. <http://doi:10.3389/fmicb.2015.01391>.
- Pemán, J., Cantón, E., Quindós, G., Eraso, E., Alcoba, J., Guinea, J., et al. (2012). Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1181–1187
- Pereira, J.V., Freires, I.A., Castilho, A.R., da Cunha, M.G., Alves, H.S., & Rosalen, P.L. (2016). Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology*, 54, 2312-2319. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2016.1155629>.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Review*, 20, 133-163.
- Pfaller, M.A., Castanheira, M., Messer, A.S., Moet, G.J., & Jones, R.N. (2010). Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, 278–283.

Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., & López-Ribot, J. L. (2013). Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 726–730

Quindós, G. (2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31, 42–48.

Rahman, S.U., Ismail, M., Khurram, M., Ullah, I., Rabbi, F., & Iriti, M. (2017). Bioactive Steroids and Saponins of the Genus *Trillium*. *Molecules*, 22, 2156. doi:10.3390/molecules22122156

Rane, H. S., Bernardo, S. M., Howell, A. B., & Lee, S. A. (2013). Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 428–436.

Rasteiro, V.M.C., da Costa, A.C.B.P., Araújo, C.F., de Barros, P.P., Rossoni, R.D., Anbinder, A.L., et al. (2014). Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 489. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/489>

Raut, J.S., Shinde, R.B., Chauhan, N.M., & Karuppayil, S.M. (2013). Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29, 87–96.

Reis, N.T., Lelis, T.C., Mendonça, A.T., & Chavasco, J.K. (2011). Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans*. *Revista de Universidade Vale Rio Verde*, 9, 337-343.

Rocha, E.A., Carvalho, A.V., Andrade, S.R., Medeiros, A.C., Trovão, D.M., Costa, E.M. (2013). Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34, 351-355.

Roque, L., Molpeceres, J., Reis, C., Rijo, P., & Pinto Reis, C. (2017). Past, recent progresses and future perspectives of nanotechnology applied to antifungal agents. *Current Drug Metabolism*, 18, 280-90.

Rossoni, R.D., Barbosa, J.O., Vilela, S.F.G., dos Santos, J.D., de Barros, P.P., Prata, M.C.A., et al. (2015). Competitive interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PLoS One*, 10, e0131700. doi:10.1371/journal.pone.0131700

Sajjadi, S.T., Saboora, A., & Mohammadi, P. (2016). Comparison of aglycon and glycosidic saponin extracts of *Cyclamen coum* tuber against *Candida* spp. *Current Medical Mycology*, 2, 40-44.

Sampaio, T.P.D., Cartaxo-Furtado, N.A.O., de Medeiros, A.C.D., Alves, H.S., Rosalen, P.L., Pereira, J.V. (2017). Antimicrobial Potential of Plant Extracts and Chemical Fractions of

Sideroxylon obtusifolium (Roem. & Schult.) T.D. Penn on Oral Microorganisms. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 18, 392-398.

Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., & Rehder, V.L.G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35,275-280.

Sharifzadeh, A., Khosravi, A.R., Shokri, H., & Tari, P.S. (2017). Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 107, 390-396.

Shih, Y.H., Chang, K.W., Hsia, S.M., Yu, C.C., Fuh, L.J., Chi, T.Y., et al. (2013). *In vitro* antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines. *Microbiological Research*, 168, 254–262.

Siddiqui, Z.N., Farooq, F., Musthafa, T.N.M., Ahmed, A., & Khan, A.U. (2013). Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivates. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17, 237-243.

Silva, R.S., Oliveira, K.M.S., Cavalcante, G.M. (2017). Atividade antifúngica de *Sideroxylon obtusifolium* frente a diferentes espécies de *Candida* sp. *Estação Científica (UNIFAP)*,7, 95-102.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 288–305.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., & Petrovick, P.R. (2004). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. (5 ed). Florianópolis: UFRGS.

Soberón, J.R., Sgariglia, M.A., Pastoriza, A.C., Soruco, W.M., Jägerc, S.N., Labadie, G.R. et al. (2017). Antifungal activity and cytotoxicity of extracts and triterpenoid saponins obtained from the aerial parts of *Anagallis arvensis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 203,233–240.

Souza, L.B.F.C., Silva-Rocha, W.P., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., Terezinha I. E. Svidzinski, T.I.E., Milan, E.P., et al. (2018). Influence of *Eugenia uniflora* Extract on Adhesion to Human Buccal Epithelial Cells, Biofilm Formation, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida* spp. from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients. *Molecules*, 23, 2418; doi:10.3390/molecules23102418.

Teodoro, G.R., Gontijo, A.V.L., Salvador, M.J., Tanaka, M.H., Brighenti, F.L., Delbem, A.C.B., et al. (2018). Effects of Acetone Fraction From *Buchenavia tomentosa* Aqueous Extract and Gallic Acid on *Candida albicans* Biofilms and Virulence Factors. *Frontiers in Microbiology*, 9, 647. [http://doi: 10.3389/fmicb.2018.00647](http://doi:10.3389/fmicb.2018.00647)

Yun, J., Lee, H., Ko, H.J., Woo, E.R., & Lee, D.G. (2015). Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848, 695– 701.

6 CONCLUSÃO

1. A análise fitoquímica da FDIC das folhas de *S. obtusifolium* identificou a presença de compostos bioativos como saponinas, taninos, fenólicos totais, flavonoides, alcaloides, esteroides e triterpenos, sendo os compostos fenólicos e saponinas os principais metabólitos secundários encontrados;
2. A FDIC apresentou atividade antifúngica sobre todas as cepas de *Candida* spp testadas, com ação fungistática sobre a maioria das leveduras;
3. A fração diclorometano apresentou atividade fungicida sobre *C. albicans* quando exposta a sua ação por um período de vinte e quatro horas;
4. A fração diclorometano de *S. obtusifolium* apresentou atividade antiaderente e antibiofilme sobre cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e sobre a associação entre as duas espécies.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.30, p.41–50, 2011.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, C.M. et al. Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. **Brazilian Oral Research**, v.32, e41,2018.
- ALVES, J.J; NASCIMENTO, S.S. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri paraibano. **Revista Geográfica Acadêmica**, v. 4, p. 73-85, 2010.
- ANDES, D. et al. Impact of antimicrobial dosing regime non evolution of drug resistance *in vivo*: fluconazole and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v.50, p.2374-2383, 2006.
- Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014.
Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Acesso em 14 de Junho de 2020.
- AQUINO, P. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. **Acta Biológica Colombiana**, v.21, n.1, p.131-140,2016.
- ARAÚJO, D. et al. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v.25, p.62–75,2017.
- ARAÚJO-NETO, V. et al. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex Roem. & Shult) T.D.Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v.20, n.6, p.933-938, 2010.
- ARENDRUP, M. C. et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: Data from a nationwide fungaemia surveillance programme. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p. 343–353, 2013.
- BAKHSI, M. et al. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. **Gerodontology**, v.29, n.2, e680-4,2012.
- BAKHTIARI, S. et al. The Effects of Cinnamaldehyde (Cinnamon Derivatives) and Nystatin on *Candida Albicans* and *Candida Glabrata*. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v.7, p. 1067-1070, 2019.
- BASSO, F.G. et al. *In Vitro* effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, p. 502-510, 2011.

BERKOW, E.L.; LOCKHART, S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v.10, p.237–245,2017.

BISWAS, S.; VAN DIJCK, P.; DATTA, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v.71, p. 348–376, 2007. doi:10.1128/MMBR.00009-06.

BONGOMIN, F. et al. Global and multinational prevalence of fungal diseases - estimate precision. **Journal of Fungi**, v.3, e57, 2017. doi: 10.3390/jof304005

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

CAO, Y. et al. *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, p.73–77, 2008.

CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O. et al. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, (Supl. 3) p.1091-1096, 2015.

CARTAXO-FURTADO, N.A.O. et al. Physicochemical characterization of a new raw material obtained from leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeel (Myrtaceae). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.127, p. 1137–1141, 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10973-016-5483-x>

CASTRO, L.Á. et al. Pseudomembranous Candidiasis in HIV/AIDS Patients in Cali, Colombia. **Mycopathologia**, v.175, p.91–98,2013.

CAVALCANTI, Y.W. et al. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. **Biofouling**, v. 32, n. 2, p. 123-134, 2016. doi: 10.1080/08927014.2015.1125472.

CHAFFIN, W.L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v.72, p.495–544, 2008. doi:10.1128/ mibr.00032-07

CHAKRABARTI, A. et al. (2009). Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v.41, p.275–284, 2009.

CHANDRA, S.; DE MEJÍA GONZALEZ, E. Polyphenolic Compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CLARCK-ORDÓÑEZ, I. et al. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. **Medical Mycology**, v.00, n.00, p.1-10,2016.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A3 NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**. Pensilvânia: NCCLS; 2008. 59p.

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

COSTA, R.S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. 2010. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

DA CUNHA, M.G., et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13:23, 2013. doi: 10.1186/1472-6882-13-23.

DALLEAU, S. et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, p.572–576, 2008.

DE ALMEIDA, L.F.D. et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.74, p.393–398, 2016.

DE AQUINO, P.E.A. et al. The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S,4R) - trans -4-hydroxy- L -proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. **Phytomedicine**, v. 24, p.14–23,2017.

DE AQUINO, P.E.A. et al. The Wound Healing Property of N-Methyl-(2S,4R)-trans-4-Hydroxy-L-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* is Related to its Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v.24, p.1-11,2019.

DE BARROS, P.P.et al. *Candida krusei* and *Candida glabrata* reduce the filamentation of *Candida albicans* by downregulating expression of HWP1 gene. **Folia Microbiologica**, v.62, p.317–323,2017.

DE CASTRO, R.D. et al. Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 149-156, 2013. doi: 10.9771/cmbio.v12i2.8448

DE VASCONCELOS, L.C. et al. Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. **Brazilian Dental Journal**, v.25, p.277–281, 2014.

ELLER, S.C.W.S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, p.131-136,2015.

ESTIVILL, D. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **Journal of Microbiological Methods**, v.86, p.238-242, 2011.

FAVRE-GODAL, Q. et al. (2015). Anti-*Candida* Cassane-Type Diterpenoids from the Root Bark of *Swartzia simplex*. **Journal of Natural Products**, v.78, p. 2994–3004, 2015.

- FERREIRA, G.L. et al. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, 147804, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/147804>
- FIGUEIREDO, F.J.; LIMA, V.L.A.G. Antioxidant activity of anthocyanins from quixabeira (*Sideroxylon obtusifolium*) fruits. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.3, p.473-479,2015.
- FORD, C.B. et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v.4,n.1, e00662,2015.
- GHOSH, P.N. et al. Diagnosing Emerging Fungal Threats: A One Health Perspective. **Frontiers in Genetics**, v.9, 376,2018. doi: 10.3389/fgene.2018.00376
- GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v.59, p.145-150,2016.
- GIRARDOT, M.; IMBER, C. Novel strategies against *Candida* biofilms: interest of synthetic compounds. **Future microbiology**, v.11, p.69-79, 2016.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p. 374-381, 2007.
- GOMES, R. et al. Biologia floral de *Manilkara subsericea* e de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) em restinga. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2,p. 271-283,2010.
- GOW, N. A. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n.2, p. 112–122,2013.
- GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371,2016. doi: 10.1098/rstb.2015. 0462
- HASSAN, S.M. et al. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. **Food Chemistry**, v.119, p. 600–605, 2010.
- HELLSTEIN, J.W.; MAREK, C.L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head and Neck Pathology**, v.29, p.1-8, 2019.
- HÖFLING, J.F. et al. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. **Mycopathologia**, v.172, p.117-124, 2011.
- HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.
- JENSEN, R.H. et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance *in vivo* in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, n.9,p. 2551–2555,2015.

KANG, K.; FONG, W.P.; TSANG, P.W. Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. **Mycopathologia**, v.170, p. 391–396, 2010.

KASAI, R. et al. Sweet and bitter cucurbitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*. **Phytochemistry**, v.26, p.1371-1376, 1987.

KLEPSEK, M.E. et al. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41,n.6,p. 1392–1395,1997.

KOJIMA, H. et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v.29, p.2351-2355, 1990

KOMAKI, N. et al. Antifungal mechanism of hinokitiol against *Candida albicans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.735–737, 2008.

KONG, E.F. et al. Clinical implications of oral candidiasis: host tissue damage and disseminated bacterial disease. **Infection and Immunity**, v.83, p. 604-613, 2015.

KVASNICKOVA, E. et al. Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellviva device. **Journal of Microbiological Methods**, v.118, p.106–112, 2015.

LANZOTTI, V. et al. (2012). Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L. **Phytochemistry**, v.74, p.133–139, 2012.

LEITE, N.S. et al. Avaliação das atividades cicatrizantes, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, p.164-170, 2015.

LI, Y. et al. Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8,2018. doi: 10.3389/fcimb.2018.00286

LO, H.J. et al. Cph1p negatively regulates MDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.45,n.6,p.617-621, 2015.

LUBIAN, C.T. et al. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.157-162, 2010.

LYU, X. et al. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug Design, Development and Therapy**, v.10, p.1161–1171,2016

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n.4, 1993.

MARSH, P.D. (2010). Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**, 38, S11-S15.

MARTINS, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). *In Vivo* Anti-*Candida* Activity of Phenolic Extracts and Compounds: Future Perspectives Focusing on Effective Clinical Interventions. **BioMed Research International**, 2015, 247382. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/247382>.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150p.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MIRANDA-CADENA, K. 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, p.100–107, 2018

MONTEIRO, M.H.D.A.; FRAGA, S.A.P.M. Fitoterapia na odontologia: levantamento dos principais produtos de origem vegetal para saúde bucal. **Revista Fitos**, v.9, p.265-268, 2015.

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

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

NAGLIK, J.R. et al. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 1323–1327, 2006.

ORENSTEIN, N.P., TAYLOR, T. A nonsurgical approach to treating aggressive inflammatory papillary hyperplasia: a clinical report. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.111, n.4, p. 264–268, 2014.

OZCELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v.49, p.396–402, 2011.

PARK, Y.-N. et al. Protocol for Identifying Natural Agents That Selectively Affect Adhesion, Thickness, Architecture, Cellular Phenotypes, Extracellular Matrix, and Human White Blood Cell Impenetrability of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.61, e01319-17, 2017.

PASSOS OLIVEIRA, A. et al. Metabolite Profiling of the Leaves of the Brazilian Folk Medicine *Sideroxylon obtusifolium*. **Planta Medica**, v.78, p.703-710, 2012.

PATIL, S. et al. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.01391.

PEMÁN, J. et al. (2012). Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p.1181–1187, 2012.

PEREIRA, J.V. et al. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharmaceutical Biology**, v.54,2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1155629>

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Review**, v.20, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M.A. et al. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p. 278–283, 2010.

PIERCE, C. G. et al. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v.13, p. 726–730, 2013.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, p.42–48, 2014.

RAHMAN, S.U. et al. Bioactive Steroids and Saponins of the Genus *Trillium*. **Molecules**, v.22, 2156, 2017.[doi:10.3390/molecules22122156](https://doi.org/10.3390/molecules22122156)

RANE, H. S. et al. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.69, p. 428–436, 2013.

RASTEIRO, V.M.C. et al. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, 489, 2014. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/489>

RAUT, J.S. et al. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. **Biofouling**, v.29, p.87–96, 2013.

REINHARDT, L.C. et al. Sensitivity to antifungals by *Candida* spp samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC). **Brazilian Journal of Biology**, v.80, p.266-272,2020.

REIS, N.T. et al. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans*. **Revista de Universidade Vale Rio Verde**, v.9, p. 337-343, 2011.

ROCHA, E.A. et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, p.351-355, 2013.

ROQUE, L. et al. Mucoadhesive assessment of different antifungal nanoformulations. **Bioinspiration & Biomimetics**, v.13, 055001,2018.

ROQUE, L. et al. Past, recent progresses and future perspectives of nanotechnology applied to antifungal agentes. **Current Drug Metabolism**, v.18, p. 280-90, 2017.

ROSSONI, R.D. et al. Competitive interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. **PLoS One**, v.10, e0131700, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0131700

SAJJADI, S.T. et al. Comparison of aglycon and glycosidic saponin extracts of Cyclamen coum tuber against *Candida* spp. **Current Medical Mycology**, v.2, p.40-44, 2016.

SAMPAIO, T.P.D. et al. Antimicrobial Potential of Plant Extracts and Chemical Fractions of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn on Oral Microorganisms. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.18, n.5, p.392-398,2017.

SANGUINETI, M. et al. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanism and clinical impact. **Mycoses**, v.58, p.2-13, 2015.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004

SHARIFZADEH, A. et al. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v.107, p.390-396, 2017.

SHIH, Y.H. et al. *In vitro* antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines. **Microbiological Research**, v.168, p.254–262, 2013

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

SILVA, R.S. et al. Atividade antifúngica de *Sideroxylon obtusifolium* frente a diferentes espécies de *Candida* sp. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, p. 95-102,2017.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p. 288–305, 2012.

SILVA, S. et al. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal of Fungi (Basel)**, v.3, n.1, p.8, 2017.doi: 10.3390/jof3010008

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: UFRGS, 2004.

SIMÕES, R.J. et al. Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. **Odontologia Clínico-Científica**, v.12, p.19-22, 2013.

SOBERÓN, J.R. et al. (2017). Antifungal activity and cytotoxicity of extracts and triterpenoid saponins obtained from the aerial parts of *Anagallis arvensis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.203, p.233–240, 2017

SOUZA, L. B. F. C. et al. Influence of *Eugenia uniflora* Extract on Adhesion to Human Buccal Epithelial Cells, Biofilm Formation, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida* spp. from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients. **Molecules**, v.23, 2418, 2018. doi:10.3390/molecules23102418

TEODORO, G.R. et al. Effects of Acetone Fraction From *Buchenavia tomentosa* Aqueous Extract and Gallic Acid on *Candida albicans* Biofilms and Virulence Factors. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 647,2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00647

VIEIRA, A.J.H.; SANTOS, J.I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.49,n.3,p.235-239, 2017.

YUN, J. et al. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1848, p. 695– 701, 2015.

ANEXOS

ANEXO A –Normas para publicação Periódico Archives of Oral Biology



ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

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



ISSN: 0003-9969

DESCRIPTION

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the oral and craniofacial sciences including:

Developmental biology Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Microbiology Biology of dental caries and periodontal disease Forensic dentistry Neuroscience Salivary biology Mastication and swallowing Comparative anatomy Paeleodontology *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. Journal Metrics

AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

IMPACT FACTOR

2019: 1.931 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Elsevier BIOBASE
 Nutrition Research Newsletter
 Nutrition Abstracts and Reviews Series
 PharmacoEconomics and Outcomes News
 Pig News and Information
 Reactions Weekly
 Review of Medical and Veterinary Entomology
 Science Citation Index
 SIIC Data Bases
 Soils and Fertilizers
 Sugar Industry Abstracts
 Tropical Diseases Bulletin
 Veterinary Bulletin
 Vitis Viticulture and Enology Abstracts
 Biological Abstracts
 Animal Breeding Abstracts
 BIOSIS Previews
 Current Awareness in Biological Sciences
 Abstracts in Anthropology
 Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
 Dairy Science Abstracts
 GeoRef
 Index Veterinarius
 Inpharma Weekly
 Medical and Surgical Dermatology
 Abstracts of Mycology
 AgBiotech News and Information
 Maize Abstracts Online
 Postharvest News and Information
 Review of Agricultural Entomology
 Small Animals
 Soybean Abstracts (Online Edition)
 Speleological Abstracts
 Agris
 Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
 Arts and Humanities Citation Index
 CABI Information
 Cancerlit
 Gale Database of Publications & Broadcast Media
 Global Health
 Inside Conferences
 ISI Science Citation Index
 Pascal Francis
 RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)
 Web of Science
 SPORTDiscus
 TOXFILE
 UnCover
 Zoological Record
 BIOSIS Toxicology
 CSA Life Sciences Abstracts
 Research Alert
 BIOSIS Citation Index
 Elsevier BIOBASE
 Chemical Abstracts
 Current Contents - Life Sciences
 Current Contents
 Current Contents
 Current Contents
 PubMed/Medline

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

S.W. Cadden, University of Dundee, DD1 4HN, Dundee, United Kingdom
F. T. Lundy, Queen's University Belfast, BT7 1NN, Belfast, United Kingdom

Associate Editors

G.N. Belibasakis, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
P.M. Castelo, Federal University of Sao Paulo, Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Diadema, Brazil
D. Grenier, Laval University, Quebec, Quebec, Canada
J.T. Wright, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States

Editorial Board

V. Arana-Chavez, São Paulo, Brazil
Z. Bian, Wuhan, China
G. H. Carpenter, London, United Kingdom
J-h Chen, Xian, China
K. Cogo-Müller, São Paulo, Brazil
C. Dawes, Winnipeg, Canada
X. Duan, Xian, China
M.B.D. Gavião, Campinas, Brazil
H. van der Glas, Utrecht, Netherlands
S. Herring, Seattle, United States
Y. Jin, Xian, China
C. P. McArthur, Kansas City, United States
L. Mei, Dunedin, New Zealand
G. Murray, Sydney, Australia
J. Y. Ro, Baltimore, United States
C. Robinson, Leeds, United Kingdom
L. P. Samaranayake, Sai Ying Pun, Hong Kong
B.J. Sessle, Toronto, Canada
P.T. Sharpe, London, United Kingdom
A.J. Smith, Birmingham, United Kingdom
P. Stashenko, Cambridge, United States
D. Steinberg, Jerusalem, Israel
H. Suda, Tokyo, Japan
K. Tanne, Higashi-Hiroshima, Japan
L. Walsh, Brisbane, Australia
M.Q. Wang, Xian, China

Editor-In-Chief Emeritus

B. Proctor, London, United Kingdom

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Professor S W Cadden, Dundee, Scotland
Dr Fionnuala T. Lundy, Northern Ireland, UK

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

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

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

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

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

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

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

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

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

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Authorship

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

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

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

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

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

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

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

Article structure

Manuscript Structure

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

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

Results or Findings

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

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

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

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

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

Keywords

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

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see

Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

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

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

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

Illustration services

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

Tables

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

Data references

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

APA (American Psychological Association) 7th Edition

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

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

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

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

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that P=0.000 (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is P<0.0005.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>