



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA**

MAYRA LETICIA CONCEPCION FRETES CORRALES

**EFEITO *IN VITRO* DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*ILEX
PARAGUARIENSIS*) FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA*
SPP.**

MARINGÁ

2017

MAYRA LETICIA CONCEPCION FRETES CORRALES

Efeito *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
frente a leveduras do gênero *Candida* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada do Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia Integrada.

Orientador: Prof. Dr. André Gasparetto.

Maringá

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C823e Corrales, Mayra Leticia Concepcion Fretes
Efeito in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) frente a leveduras do gênero *Candida* spp. / Mayra Leticia Concepcion Fretes Corrales. -- Maringá, 2017.
78 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Gasparetto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2017.

1. Erva mate (*Ilex paraguariensis*). 2. *Candida* spp. 3. Fatores de virulência. 4. Resinas acrílicas. I. Mathias, Paulo Cezar de Freitas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Pós-Graduação em Odontologia Integrada. III. Título.

CDD 21.ed. 617.6

ECSL

MAYRA LETICIA CONCEPCION FRETES CORRALES

Efeito *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
frente a leveduras do gênero *Candida* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada do Departamento de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia Integrada.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Gasparetto

Departamento de Odontologia / Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Departamento de Farmácia / Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho

*A minha família, pelo amor e apoio nos momentos mais difíceis,
sempre estando ao meu lado, me incentivando e motivando.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades;

*A minha família, que estiveram sempre presentes me apoiando e incentivando para que eu pudesse terminar essa etapa importante da
minha vida;*

Às minhas avós Hilda e Simeona, e avôs Enrique e Ángel Raimundo;

*Ao meu orientador Prof. Dr. André Gasparetto, por compartilhar experiências e ter me ajudado e guiado no decorrer deste trabalho,
obrigada por toda a confiança depositada em mim;*

*Aos professores Terezinha Inez Estivalet Svidzinski e João Palazzo
Melo, pela ajuda, generosidade, paciência e discussões bastante
produtivas para a conclusão deste trabalho, e por aceitar formar
parte da minha banca, MUITO OBRIGADA!;*

*A pós doutoranda Janine Silva Ribeiro Godoy , pela amizade e ajuda
em todo momento na execução dos experimentos, por dedicar, horas,
dias, meses, que tenho certeza que são preciosos em seus dia-a-dia
corridos;*

*Agradeço também aos meus amigos e colegas da UEM, que sempre
estiveram me ajudando quando eu precisava e me apoiaram no
decorrer desses dois anos;*

A todos os professores do programa de Pós-graduação de odontologia da UEM, por compartilhar os seus conhecimentos;

A equipe do laboratório de Micologia, pela amizade e ensinamentos;

A equipe do laboratório Palafito, em especial às mestrandas Mariana Nascimento, Taisa, e pós doutoranda Dani, pela amizade e ajuda na execução dos experimentos;

À equipe administrativa do programa de pós graduação de odontologia, em especial a Sônia, pelo carinho, e predisposição;

Aos meus amigos estrangeiros que fiz nestes dois anos de mestrado, nunca me esquecerei dos ótimos momentos que passamos juntos!

A Organização dos Estados Americanos (OEA), por ter me dado à oportunidade de concorrer a uma bolsa de mestrado, e assim cumprir o que ao começo foi um sonho pra mim;

Ao programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá, por ter me selecionado, e apoiado durante esses dois anos incríveis de mestrado.

À fabrica fábrica Kovalski Indústria de erva-mate Ltda-Chapecó, SC pelo fornecimento do material vegetal;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS!!

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis".

(José de Alencar)

Fretes ML. Efeito *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) frente a leveduras do gênero *Candida* spp. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Maringá. 2017

RESUMO

Candida spp., micro-organismo encontrado como comensal do corpo humano, no trato digestivo humano incluindo a cavidade oral, porém é dotado de atributos de virulência e, sob determinadas condições pode causar danos ao hospedeiro, sendo assim, considerado patógeno oportunista. O processo de adesão e invasão microbiana é o resultado da interação destes atributos e das condições predisponentes do hospedeiro. Diversos produtos de origem vegetal mostraram ser potencialmente interessantes, no que se refere a sua atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* dos extratos brutos das folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), frente a leveduras do gênero *Candida* spp., assim como o seu impacto em alguns atributos de virulência. No total foram avaliados dez extratos, a partir de duas árvores, caracterizando dois grupos, Indivíduo 1 (I1) e Indivíduo 2 (I2) segundo diferentes ambientes de coleta em relação ao sol. O perfil de susceptibilidade foi utilizado como triagem, do qual foram selecionadas espécies, *Candida albicans* e *C. krusei* e dois extratos M2 e M7, obtidos com água quente, a fim de mensurar os principais fatores de virulências, relacionados com o perfil de hidrofobicidade, adesão e produção de biofilme dessas leveduras. Os resultados evidenciaram que os extratos de erva-mate exibiram comportamentos relevantes frente *Candida albicans* e *C. krusei* diante dos atributos de virulência avaliados. Foi observada nas duas cepas, por meio do teste de hidrofobicidade, uma redução na capacidade de migração para o hidrocarboneto, caracterizando uma baixa afinidade por superfícies abióticas, o que pode ser notado pela diminuição na formação de biofilme a 24 h, e nenhuma relacionada à adesão em resina acrílica. Por outro lado, o processo de adesão em células epiteliais bucais (CEB) em *C. albicans*, mostrou que houve uma redução não significativa na capacidade em aderir, mesmo que seu perfil tende mais para afinidade em superfícies bióticas. Este fato, possivelmente está relacionado com a alteração estrutural provocada pelos extratos, o que pode ser bem visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), interferindo nesse potencial. Este estudo com erva mate (*Ilex paraguariensis*), apresentou um efeito antimicrobiano frente as espécies de *C. albicans* e *C. krusei*, assim como nos principais atributos de virulência, reduzindo a capacidade em formar biofilme, indicando uma possível ação de prevenção contra candidoses orais. Assim, *Ilex paraguariensis* pode ser uma fonte de pesquisa para novos agentes antimicrobianos naturais.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, Erva-Mate, *Candida* spp., Fatores de virulência, Resinas Acrílicas.

Fretes ML. *In vitro* activity of extract from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) against *Candida* spp. Dissertation (Masters in Dentistry). State University of Maringá, 2017.

ABSTRACT

Candida spp. are microorganisms found as commensals in the human digestive tract, especially in the oral cavity, and under certain conditions, express virulence attributes that can cause damage to the host, being considered as an opportunistic pathogen. The process of microbial invasion and adhesion is the result of the interaction of these attributes and the predisposing conditions of the host, thus understood. The level of hydrophobicity of the cell surface of microorganisms is closely related to pathogenicity. Several products of plant origin have been shown to be potentially interesting with regard to their antimicrobial activity. The objective of this work was to evaluate the effect of raw yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) on *Candida albicans* and *Candida non Candida albicans* (CNCA) species and also its action against the main virulence attributes. In total, five types of extracts of each individual were used, characterized in two groups, as Individual 1 (I1) and Individual 2 (I2) according to the different collection environments in relation to the sun. Each group used five different types of extracting liquid; cold water, hot water, 50% alcohol, 70% alcohol and 96% alcohol. The susceptibility profile was used as screening, from which two important strains, *Candida albicans* and *C. krusei*, and two extracts M1 and M2, obtained with hot water were selected, allowing to measure the main virulence factors, related to the profile of hydrophobicity, adhesion and biofilm production of these yeasts. The results evidenced that extracts of yerba mate showed relevant behaviors against *Candida albicans* and *C. krusei* and also against virulence factors evaluated. A reduction in hydrocarbon migration capacity was observed in the two strains through the hydrophobicity test, characterizing a low affinity for abiotic surfaces, which can be noticed by the decrease in biofilm formation at 24h, and none related to adhesion in acrylic resin, which can be aided by the extreme polish of the material. On the other hand, the process of adhesion in oral epithelial cells (CEB) in *C. albicans*, showed that there was a non-significant reduction in the ability to adhere, even if its profile walks more towards affinity on biotic surfaces. Possibly related to the structural alteration caused by the extracts, which can be well visualized by scanning electron microscopy (SEM), interfering in this potential. Our study showed that the yerba mate (*Ilex paraguariensis*) had a good antimicrobial effect against *C. albicans* and *C. krusei* species, as well as on the main attributes of virulence, reducing the capacity to form biofilm. Indicating a possible action of prevention against oral candidoses. However, *Ilex paraguariensis* is a research source for novel natural antimicrobial agents

Keywords: *Ilex paraguariensis*, Yerva mate, Erva-mate, *Candida*, Virulence Factors, Acrylic Resin

LISTAS DE FIGURAS

Artigo

- Figura 1.** Eletromicrografias obtidas em MEV de *C. albicans* tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. **a:** *C. albicans* não tratada (controle) em 1600 x. **b:** *C. albicans* não tratada (controle) em 12000 x. **c:** *C. albicans* tratada com o extrato M2 em 1600 x. **d:** *C. albicans* tratada com o extrato M2 em 12000 x. **e:** *C. albicans* tratada com o extrato M7 em 1600 x. **f:** *C. albicans* tratada com o extrato M7 em 12000 x.....44
- Figura 2.** Eletromicrografias obtidas em MEV de *C. krusei* tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. **a:** *C. krusei* não tratada (controle) em 1600 x. **b:** *C. krusei* não tratada (controle) em 12000 x. **c:** *C. krusei* tratada com o extrato M2 em 1600 x. **d:** *C. krusei* tratada com o extrato M2 em 12000 x. **e:** *C. krusei* tratada com o extrato M7 em 1600 x. **f:** *C. krusei* tratada com o extrato M7 em 12000 x.....45
- Figura 3. A)** Influência do extrato de ILEX sobre *C. krusei* ($p < 0,05$) e **B)** *C. albicans* ($p > 0,05$) considerando o perfil de hidrofobicidade em superfície celular (HSC). Teste Anova.46
- Figura 4.** Perfil de adesão de **A)** *C. krusei* e **B)** *C. albicans* sobre superfície de resina acrílica após exposição ao PBS, extrato de ILEX e CLO ($p > 0,05$). Teste Anova.47
- Figura 5.** Perfil de aderência de *C. albicans* sobre CEB.....48
- Figura 6.** Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **A)** Extrato M2, proporção de 1,7 de cafeína para 1 de ác. clorogênico e **B)** extrato M7, proporção de 4 de cafeína para 1 de ác. Clorogênico.....48
- Figura 7.** Curva de calibração e equação da reta dos compostos cafeína e ácido clorogênico.49

Apêndices

APÊNDICE A. Preparação do extrato bruto de erva mate.	62
Figura 1. Separação das folhas e talhos	62
Figura 2. Secagem das folhas.....	62
Figura 3. Trituração das folhas.....	62
Figura 4. Preparação do extrato.....	62
Figura 5. Filtração do extrato de erva mate.....	62
Figura 6. Rotaevaporação do extrato de erva mate.	62
Figura 7. Liofilização dos extratos	63
Figura 8. Armazenamento dos extratos em frasquinhos de vidro com identificação	63
Figura 9 – 10. Preparo dos extratos para os ensaios com água destilada.....	63
APÊNDICE B. <i>Candida</i> spp. e condições de crescimento	63
Figura 11. Crescimento das cepas em ágar inclinado de <i>Candida sp</i> , após cultivo de 24 h a 37° C na estufa.....	63
Figura 12. Preparo do Inóculo 24 h antes do experimento.....	63
Figura 13. Crescimento das cepas em Caldo Sabouraud a 37 °C.	64
Figura 14. Lavagens dos inóculos com água destilada.	64
APÊNDICE C. Ensaio de Hidrofobicidade de superfície celular (HSC).....	64
Figura 16. Tubos após adição do <i>n</i> -hexadecano, retirada da fase aquosa e pipetada para uma microplaca de 96 poços.	64
Figura 15. Placa de 96 poços utilizada no ensaio de hidrofobicidade	64
APÊNDICE D. Adesão em células epiteliais bucais (CEB)	65
Figura 17. Microscópio óptico de luz invertida usado na contagem de UCF/campo do ensaio de adesão em CEB.....	65
Figura 18. Adesão de <i>C. albicans</i> na CEB (Microscópio óptico). A) controle B) Após extrato de erva mate	65
APÊNDICE E. Adesão em superfícies de resina acrílica	65

Figura 19. Pipetagem do extrato de erva mate para uma placa de 24 poços com corpos de prova em resina acrílica.....	65
Figura 20. Placa de 24 poços com corpos de prova em resina acrílica	65
Figura 21. Inóculo inserido em gotas em SDA, após 18 h de incubação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e contagem das UFC em três diluições 1:1000, 1:100 e 1:10.	65
Figura 22. Microscópio electrónico de varredura (MEV).	66
Figura 23. Aparelho de ponto crítico	66
Figura 24. Eletromicrografias obtidas em MEV de <i>C. albicans</i> tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. a: <i>C. albicans</i> não tratada (controle) em 1600 x. b: <i>C. albicans</i> não tratada (controle) em 12000 x. c: <i>C. albicans</i> tratada com o extrato M2 em 1600 x. d: <i>C. albicans</i> tratada com o extrato M2 em 12000 x. e: <i>C. albicans</i> tratada com o extrato M7 em 1600 x. f: <i>C. albicans</i> tratada com o extrato M7 em 12000 x.....	66
Figura 25 Eletromicrografias obtidas em MEV de <i>C. krusei</i> tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. a: <i>C. krusei</i> não tratada (controle) em 1600 x. b: <i>C. krusei</i> não tratada (controle) em 12000 x. c: <i>C. krusei</i> tratada com o extrato M2 em 1600 x. d: <i>C. krusei</i> tratada com o extrato M2 em 12000 x. e: <i>C. krusei</i> tratada com o extrato M7 em 1600 x. f: <i>C. krusei</i> tratada com o extrato M7 em 12000 x.....	67
APÊNDICE F. Equipamentos utilizados nos ensaios	67
Figura 26. A) Leitora de microplaca (Expert plus – ASYS, UK) B) Agitador de tubos (Vórtex AP56 - Phoenix, Brasil); C) Espectrofotômetro (Baush & Lomb); D) Incubadora (Shaker NT712).....	67

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Extratos de erva-mate preparados com diferentes líquidos extratores a partir dos indivíduos 1 e 2.	36
Tabela 2. Teste de susceptibilidade dos extratos de erva-mate (ILEX) contra <i>C. albicans</i> e CNCA, utilizando cinco extratos de cada indivíduo (I1, I2).....	37
Tabela 3. Concentração inibitória mínima dos extratos M2 e M7 de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	43
Tabela 4. Formação de biofilme (Shin, 2002), antes e após exposição dos extratos de erva-mate (ILEX).	46
Tabela 5. Perfil de aderência de <i>C. albicans</i> sobre células epiteliais bucais, (Teste Tukey).	47
Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos: cafeína, ácido clorogênico, e as misturas de 4:1 de cafeína, e 1,7:1 de cafeína, simulando as concentrações das frações encontradas nos extratos M7 e M2 respectivamente	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
AC	Ácido clorogênico
C	Cafeína
CA	<i>Candida albicans</i>
CEB	Células epiteliais bucais
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CK	<i>Candida krusei</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLO	Clorexidina
CNCA	<i>Candida</i> não <i>Candida albicans</i>
DO	Densidade óptica
EB	Extrato bruto
HSC	Hidrofobicidade de superfície celular
ILEX	<i>Ilex paraguariensis</i>
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
MATH	Microbial adhesion test hydrocarbons
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
nm	Nanômetro

pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão salina fosfato
rpm	Rotações por minuto
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFC/campo	Unidades formadoras de colônias por campo
YNB	Yeast Nitrogen Broth
YPD	Yeast Peptone Dextrose
µm	Micrometro
µL	Micro litro

SUMÁRIO

I. CONTEXTUALIZAÇÃO	17
Proposição	22
Delineamento do estudo	22
REFERÊNCIAS.....	24
II. ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
1. Introdução.....	34
2. Material e métodos	35
2.1. Material vegetal	35
2.2. Perda por secagem das folhas de erva-mate.....	35
2.3. Preparação do extrato bruto de erva-mate.....	35
2.4. Obtenção das cepas e condições de cultura.....	36
2.5. Preparação das suspensões de leveduras e determinação dos controles.....	36
2.6. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM).....	37
2.7. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	38
2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
2.9. Determinação da hidrofobicidade de superfície celular (HSC)	39
2.10. Formação de biofilme.....	39
2.11. Adesão em superfície de resina acrílica.....	40
2.12. Adesão em Células Epiteliais Bucais (CEB)	41
2.13. Cromatografia líquida alta eficiência (CLAE).....	42
2.14. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) substâncias puras em cafeína e ácido clorogênico.....	42
2.15. Análise estatística	43
3. Resultados.....	43
3.1. Concentração inibitória mínima (CIM)	43

3.2. Microscopia eletrônica de varredura, análise em <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>	43
3.3. Formação de biofilme	45
3.4. Hidrofobicidade de superfície celular (HSC).....	46
3.5. Adesão em superfícies de resina acrílica	46
3.6. Adesão em CEB.....	47
3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	48
3.8. Concentração inibitória mínima das frações contidas em maior concentração nos extratos selecionados (CIM).....	49
4. Discussão	50
5. Conclusão:.....	53
REFERÊNCIAS.....	55
Legenda de Figuras	60
Legenda de Tabelas.....	61
APÊNDICES.....	62
ANEXO.....	68

I. CONTEXTUALIZAÇÃO

Espécies de leveduras do gênero *Candida*, encontradas na microbiota oral, correspondem aos isolados mais comuns entre as infecções humanas, pois sob determinadas condições predisponentes, podem tornar-se patogênicos e causar aproximadamente 80% das infecções de origem fúngica¹. Esses micro-organismos possuem notável relevância clínica, devido à alta frequência com que colonizam e conseqüentemente infectam o ser humano, quando o sistema imune encontra-se comprometido ou ocorre uma ruptura no balanço normal da microbiota²⁻⁷. Dentre *Candida* spp., *C. albicans* é o agente mais frequentemente isolado de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos. Pesquisas realizadas nos Estados Unidos, concluíram que *C. albicans* foi a quarta causa de infecção da corrente circulatória em hospitais⁸. Embora, estudos vêm mostrando um aumento percentual das espécies *Candida* não *Candida albicans* (CNCA), como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* também têm sido relatadas^{6,8-10}. *C. albicans* é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastocónídios) no estado saprobiótico¹⁰, estando associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), encontradas em processos infecciosos. Além disso, possui a capacidade de adaptação a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, um organismo “pleomórfico”^{3,5}.

Mesmo que o sistema imune do hospedeiro seja o principal fator responsável pelo equilíbrio entre a transição de comensalismo à patogenicidade, várias características como a hidrofobicidade celular ou superfícies abióticas, capacidade em aderir, formar biofilme, entre outras têm sido indicadas como importantes fatores de virulência. Estes, podem contribuir para a persistência da levedura na colonização bem como no desenvolvimento de infecções de origem fúngica¹¹⁻¹³.

A habilidade de transição morfológica, ou seja, de formar tubos germinativos por *C. albicans* tem sido sugerida como um dos fatores mais importantes de virulência. Desta forma, as hifas têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células

epiteliais humanas do que os blastoconídios ¹⁴, representando uma resposta da levedura e possibilitando sua adaptação a diferentes nichos biológicos ¹⁵.

A hidrofobicidade de superfície celular (HSC) também tem sido relacionada ao potencial patogênico de leveduras ^{16,17}. Quando células hidrofóbicas e hidrofílicas são comparadas, as hidrofóbicas aderem mais às superfícies abióticas e a objetos inanimados, assim como, são mais resistentes à fagocitose e tem maior capacidade em formar tubos germinativos ¹⁷. A HSC no gênero *Candida* varia de acordo com as condições de crescimento, morfologia celular e mesmo entre as diferentes espécies do gênero ^{17,18}. Apesar de que alguns estudos mostrarem que leveduras hidrofóbicas são mais virulentas que as não hidrofóbicas ^{17,19,20}, outros estudos não encontraram uma correlação entre HSC e energia livre de superfície sobre a adesão de fungos, demonstrando que só a HSC da célula não é suficiente para a atividade de adesão ²¹⁻²⁵.

Os mecanismos de aderência destas leveduras aos tecidos humanos são variados e acontecem como resultado dos sistemas de reconhecimento celular *Candida*-hospedeiro, que são extremamente complexos e envolvem uma variedade de componentes ligantes-receptores ²⁶. A aderência das leveduras às células epiteliais bucais (CEB) é reconhecida como um passo essencial na colonização microbiana, um evento chave na iniciação do processo patogênico, uma vez que a colonização prévia é aceita como fator predisponente ao processo infeccioso ²⁷.

A capacidade de um micro-organismo aderir tem como consequência a formação de biofilmes, que ocorrem em resposta a uma variedade de condições como o metabolismo da levedura, disponibilidade de nutrientes para a replicação celular e a superfície de contato, fatores ambientais, morfogênese e o tipo de espécie de *Candida* envolvida na infecção ^{16,28,29}. De maneira geral, o desenvolvimento de um biofilme envolve quatro etapas: primeiro ocorre a adesão dos micro-organismos à superfície; depois, uma formação discreta de colônias e organização de células; em seguida ocorre a secreção de matriz extracelular (polissacarídeos) e maturação de uma estrutura tridimensional, e por último a disseminação de células ^{12,13,16,29}. Desta forma os biofilmes são massas diferenciadas de micro-organismos formadas em superfícies circundadas por uma matriz extracelular que apresentam alto grau de

organização³⁰. Os biofilmes por *C. albicans* são causa de infecções associadas a dispositivos médicos, além de se comportarem como nichos protegidos de micro-organismos, não respondendo ao tratamento com antibióticos e antifúngicos, podem criar uma fonte de infecção persistente³¹. Outro fato preocupante, é que a formação de biofilme desencadeia resistência antifúngica e proteção contra a defesa do hospedeiro levando a uma importante repercussão clínica³². Os biofilmes podem se formar em inúmeras superfícies, como teflon, plásticos, látex, silicone, e especificamente na cavidade bucal sobre próteses totais e removíveis, dispositivos de aparelhos ortodônticos e superfícies de restaurações^{28,33,34}. Estudos epidemiológicos mostram que aproximadamente 70% dos portadores de próteses dentais removíveis sofrem de estomatite protética. Assim, adesão e formação de biofilmes por *C. albicans* são consideradas como pré-requisitos essenciais para a estomatite protética³⁵. Além das diferentes formas de candidíase, essas leveduras também podem estar envolvidas na etiologia de lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais³⁶⁻³⁹. O biofilme dental apresenta íntima relação com má higiene oral e com a colonização por leveduras do gênero *Candida*. A remoção mecânica constitui o método mais aceito para o seu controle, mas o uso de coadjuvantes químicos é bastante valioso⁴⁰. Pesquisas têm sido realizadas com várias substâncias em ensaios clínicos e laboratoriais com o objetivo de inibir o crescimento de micro-organismos que causam doenças na cavidade bucal. Entre estas substâncias está a solução de clorexidina⁴¹, a qual é um composto eficaz usado como antisséptico bucal devido à sua eficiência clínica sobre uma ampla gama de micro-organismos na cavidade bucal⁴¹⁻⁴³. No entanto, a aplicação de agentes antissépticos na cavidade bucal deve ser cuidadosamente acompanhada devido a seus efeitos colaterais, apesar do conhecido benefício destes agentes⁴⁴. Alguns efeitos são manchamento extrínseco no esmalte dentário e dorso lingual, hiperplasia de papilas linguais, perda do sentido da gustação, descamações na mucosa bucal, entre outras, sendo indicado somente por curtos períodos^{44,45}.

A procura por produtos naturais com atividade antimicrobiana tem merecido destaque, principalmente com o advento de cepas multirresistentes e os efeitos colaterais⁴⁶. Devido a grande demanda no uso de plantas medicinais, os estudos na área estão cada vez mais difundidos especialmente em relação aos testes de

sensibilidade em micro-organismos de importância em saúde pública, onde têm sido demonstradas diversas atividades para os extratos, entre elas, atividade antimicrobiana ^{47,48}. A Organização Mundial da Saúde incentiva o estudo de plantas medicinais, tendo como finalidade avaliar cientificamente os medicamentos fitoterápicos e os benefícios, além dos riscos do uso indevido ⁴⁹. Estima-se que de 65 a 80% da população mundial tenha nas plantas o principal recurso de atendimento básico à saúde ⁵⁰. Porém, o emprego de plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças tem sido apoiado pela classe médica e por programas oficiais de saúde ⁵¹.

No campo odontológico, o interesse por pesquisas utilizando plantas medicinais têm aumentado consideravelmente, devido à busca por novos produtos com melhor atividade farmacológica, menor toxicidade e custos mais acessíveis à população ^{23,52-57}. Desta forma, a utilização de produtos naturais associada ao tratamento preventivo poderia colaborar na redução de doenças que afetam o elemento dentário ⁵⁸.

Ilex paraguariensis St. Hil. (Aquifoliaceae), é uma planta subtropical nativa da América do Sul, que se apresenta como uma árvore que pode atingir até 18 metros de altura, popularmente denominada “mate”, “erva-mate” ou “yerba mate” ⁵⁹. A erva-mate era consumida pelos indígenas que habitavam a região sul do Brasil antes mesmo da chegada dos colonizadores, sendo sua propriedade estimulante já conhecida ⁶⁰. É encontrada principalmente na região Sul da América do Sul, Argentina, Paraguai, Uruguai, e Brasil. Neste país é distribuída pelos estados do Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Apresenta uma maior produção na região sul do Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul, devido ao consumo tradicional do chimarrão ⁶¹⁻⁶³. No entanto, a partir do final da última década do século passado, países como Estados Unidos, Alemanha e Japão passaram a importá-la em uma taxa de aproximadamente 1.000 toneladas por ano ⁶⁴.

A produção da erva-mate, basicamente, é destinado ao uso de chimarrão, tereré, ou chá-mate. No entanto, esta erva pode ser empregada para várias finalidades, tais como produção de alimentos, cosméticos, medicamentos, perfumaria, sorvetes,

produtos de higiene e limpeza, entre outras. A erva-mate destinada à fabricação de bebidas, não é consumida na sua forma natural tal como obtida após a colheita, mas ao invés disso, é submetida a várias etapas de processamento antes de ser empacotada e disponibilizada ao consumidor. As condições para processamento são muito variadas e dependentes do sabor desejado para as bebidas. Os processos podem ser diferentes em função do tempo e das temperaturas de branqueamento e secagem, porém, as etapas do processamento total, geralmente são as mesmas ⁶⁵. Entretanto tem estudos demonstrando que a atividade antimicrobiana de extratos de folhas e ramos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) pode sofrer interferência pela exposição ou não ao sol ⁹⁰.

A planta caracteriza-se por apresentar uma composição química complexa, com elevada concentração relativa de polifenóis aos quais são atribuídas atividades antioxidantes ⁶⁶ e, possivelmente, ações preventivas contra doenças como câncer, doenças cardiovasculares, entre outras ⁶⁷. O perfil fitoquímico do *Ilex paraguariensis* apresenta várias classes incluindo flavonoides, terpenoides, metilxantinas, saponinas, taninos, carotenoides, aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, glicídios, vitaminas e minerais ^{61,68-73}. Análises e estudos sobre a erva-mate revelam diversas propriedades nutritivas e farmacêuticas tais como: antioxidante, antimicrobiana, diurética, digestiva, cicatricial e estimulante, conferindo um grande potencial de aproveitamento ^{50,71,74}. O uso da planta apresenta algumas contraindicações como em casos de ansiedade, taquicardia, hipertensão, gastrites, úlceras gastrintestinais e algumas doenças hepáticas ⁷⁵.

No campo da microbiologia, pesquisas de atividade antimicrobiana utilizando extratos de plantas medicinais apresentam cada vez maior importância contra micro-organismos patogênicos. Testes realizados com extratos de *Ilex paraguariensis*, comprovaram o potencial antimicrobiano frente a uma variedade de bactérias, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens* ⁷⁶, *Staphylococcus* spp ⁵⁰, *Streptococcus mutans* ^{77,78}, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus epidermidis* ⁷⁹⁻⁸⁶, também apresentou atividade contra o vírus do Herpes simplex tipo 1 e tipo 2 ⁸⁸.

Em 2015, foi realizado um levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida*, onde concluíram que algumas plantas para ter ação, necessitam de concentrações muito altas dos extratos, com pequenas inibições de crescimento/eliminação destas leveduras, ocorrendo variações, principalmente, quanto ao método de avaliação, tipo de extrato, parte vegetal, e procedência dos isolados fúngicos, dentre elas se encontra *Ilex paraguariensis* apresentando atividade contra *C. albicans*, utilizando folhas e ramos, e como solvente o etanol⁸⁹.

Numa pesquisa realizada por De Biasi et al.⁹⁰ em *C. albicans*, bactérias gram positivas e negativas, utilizando o método de difusão de disco, observaram o efeito antimicrobiano do extrato das folhas de erva-mate em concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL utilizando como líquido extrator o etanol.

Considerando as propriedades medicinais do extrato de erva mate, estudos de atividades antimicrobianas desta espécie podem ser de grande interesse para a Odontologia.

Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* dos extratos brutos das folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), frente a leveduras do gênero *Candida* spp., assim como o seu impacto frente aos atributos de virulência.

Delineamento do estudo

Avaliou-se o efeito *in vitro* de extratos obtidos a partir das folhas da erva-mate (*I. paraguariensis*), frente a leveduras do gênero *Candida*, onde foram desenvolvidos os seguintes ensaios laboratoriais:

Preparação de diferentes extratos de ILEX;

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*;

Avaliação do impacto sobre os seguintes parâmetros de *C. albicans* e *C. krusei*:

- Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Hidrofobicidade de superfície celular (HSC);
- Capacidade de formação de biofilme;
- Adesão em corpos de prova de resina acrílica;
- Adesão em superfícies de células epiteliais bucais (CEB);

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos;

Determinação da concentração inibitória mínima das substâncias puras presentes nos extratos M2 e M7 em diferentes concentrações (CIM).

Os ensaios seguiram protocolo “adotado” pelo Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, os quais estão descritos na seção Materiais e Métodos. As cepas de *C. albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida tropicalis* (ATCC 40042), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 40147) utilizadas nos ensaios, foram fornecidas por este Laboratório.

A erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) foi fornecida pela fábrica Kovaleski Indústria de erva-mate Ltda. – Chapecó SC, Brasil, na forma de folhas e ramos onde logo foi obtido o extrato bruto, no Laboratório de Biologia Farmacêutica do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. Os ensaios foram realizados com as informações técnicas disponíveis, fornecidas por este Laboratório. Além disso, a caracterização química dos extratos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

REFERÊNCIAS

1. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007;52:1200-8
2. Elguezabal N, Maza JL, Dorronsoro S, Pontón J. Whole saliva has a dual role on the adherence of *Candida albicans* to polymethylmetacrylate. *Open Dent J* 2008;2:1-4.
3. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. *Oral Dis* 2008;14:138–43.
4. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS* 1998;106:736–42.
5. Panagoda GJ, Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; 44:29-35.
6. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont* 2003; 12:249-54.
7. Silva CRG, Melo KE, Leão MVP, Ruis R, Jorge AOC. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;30:300-5.
8. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000 2009;49:39-59.
9. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *OOOOE* 1998;85:86-93.
10. Samaranayake LP, MacFarlane TW. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980;25:603-9.
11. Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM, Svidzinski T.I.E. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2005; 159: 501–507.
12. Irie MMT, Consolaro MEL, Guedes TA, Donatti L, Patussi EV, Svidzinski TIE. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 2006;20:195–203.
13. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008;14:582–90.
14. Hamer KA, Carson CF, Riley TV. Malaleuca alternifolia (tea tree) oil inhibits germ formation by *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 2000; 38:355-62.
15. Chaffin W, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Bio Rev* 1998;62:130–80.

16. Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infect Immun* 1995;63:1373—9.
17. Masuoka J, Hazen KC. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains *Infect Immun* 2001;72:6230—6.
18. Van der Mei HC, Bos R, Busscher HJ. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids Surf B Biointerf* 1998;11:213—21.
19. Hazen KC, Hazen BW. Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1993;107:83—7.
20. Pereira T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont* 2007; 20:308—10.
21. Klotz SA. The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiol Lett* 1994;120:257-62.
22. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Rosentritt M, Handel G, Hahnel S. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. *Clin Oral Invest* 2009;13:293—99.
23. Polaquini, SRB, Svidzinski, TIE, Kimmelmeier, C, Gasparetto, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilme formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. *Arch Oral Biol* 2006;51:482-90.
24. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont* 2005;18:392—8
25. Gasparetto A. Virulência de amostras orais de *Candida albicans*: novas abordagens metodológicas no estudo da produção de exoenzimas, aderência, formação de biofilme e influência de campos magnéticos. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2004.
26. Grimaudo NJ, Nesbitt WE. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol. Immunol.* 1997; 12:168-173.
27. Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2002;70:5256-58.
28. O'toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
29. Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* Biofilm Formation. *J Dent Res* 2009;88:105-15.
30. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology.* 2006; 9(6):588-94.

31. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum DMA. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen. *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of bacteriology*. 2001; 183(18): 5385-5394.
32. Tobudic S, Kratzer C, Lassning A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*. 2012. 55:199–204.
33. Donlan R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881-90.
34. Matsuura E. Efeito in vitro do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) na Hidrofobicidade, formação e adesão de *Candida albicans* sobre poliestireno, resinas compostas e células epiteliais bucais. 2013.
35. Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation,; *Gerodontology*. 2014 Jul 28.
36. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North A* 2006;20:485–506
37. Pereira C. V. Ação das amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase dentária – estudo in vitro. *Revista Passo Fundo*, v.4, p.33-39, 1999.
38. Pereira CV, Rosa EAR, Rosa RT, Höfling JF. Ação de amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes carboidratos com ênfase na cárie dentária - estudo in vitro. *Revista da Faculdade de Odontologia - UPF*. 2010; 4(2).
39. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *International Journal of Prosthodontics*. 2006;19(3):288–93.
40. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira M do SV. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009;42(2):222–4.
41. Jardim Júnior EG, Pedrini D, Xavier EA, Jardim PS. Eficácia do listerine sobre a placa. *Revista Gaúcha Odontológica*. 1998; 46:70-78.
42. Addy M, Wright R. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouth rinses. *J Clin Periodontol* 1978;5:198-205.
43. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis* 2001;7:11—7.
44. Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci* 2003;111:144-8.
45. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels *Intern Endodont J* 2010;43:430–5.

46. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Invest* 2007;11:155–64.
47. Roberts MC 2002. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol* 2000; 28:280-297.
48. Silveira LMS, Rosas LS, Olea RSG, Gonçalves EC, Junior F, Da DC. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. *Rev bras anal clin.* 2007;39(4):299–301.
49. Schuch LFD, Wiest JM, Garcia EM, Prestes LS, Schramm RC, Coimbra H, Meireles MCA. Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2008; 36(3), 267-71.
50. Loguercio AP, Battistin A, Vargas AD, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural.* 2005; 35(2), 371-376.
51. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico.* 2005; 72(3), 353-358.
52. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Núcleo Técnico da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Cadernos de Atenção Básica*; n. 31 – Brasília : Ministério da Saúde 2012;1:156.
53. Groppo FC, Bergamaschi CC, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RHL, Andrade ED. Use of Phytotherapy in Dentistry. *Phytother Res* 2008;22:993-98
54. Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BPFA. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *OOOOE* 2007;104:709–16.
55. Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 2005;101:110—5.
56. Pistorius A, Willershausen B, Steinmeier EM, Kreisler M. Efficacy of subgingival irrigation using herbal extracts on gingival inflammation. *J Periodontol* 2003;74:616–22.
57. Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). Review. *J Med Microbiol* 2001;50:299–302.
58. Vanka A, Tandon S, Rao SR, Udupa N, Ramkumar P. The effect of indigenous *Neem Azadirachta indica* mouthwash on *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* growth. *Indian J Dent Res.* 2001;12:133–44.
59. Luiz PJL, Alves RJC, Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Rev. bras. farmacogn.* 2010; 20(1):134-139.

60. Jacques RA, Arruda EJ, Oliveira LCS, Oliveira AP, Dariva C, Oliveira JV, Caramão EB. Influence of agronomic variables on the macronutrient and micronutrient content and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55:7510-7516.
61. Evans WC. *Trease and Evans's Pharmacognosy*. 14.ed. Londres: WB Saunders Company. 1998. p403.
62. Alikaridis F. Natural constituents of *Ilex paraguariensis*. *J. Ethnopharmacol.* 1987; 20: 121-144.
63. Bruneton J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Paris: Technique et Documentation. 1993.
64. Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva Oliveira D. Caracterização físico-química da erva-mate: influencia das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. 2002;22(2):193-204.
65. Mazzafera, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food chemistry*. 1997; 60(1), 67-71.
66. Gomes da Costa AM, Nogami EM, Visentainer JV, de Souza NE, Garcia EE. Fractionation of aluminum in commercial green and roasted yerba mate samples (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and in their infusions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009; 57(1), 196-200.
67. Sun T, Tanumihardjo SA. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*. 2007; 72(9):159-165.
68. Cabrera C, Giménez R, López MC. Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington*. 2003;51: 4427-4435.
69. Burris KP, Davidson PM, Stewart Jr CN, Harte FM. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*. 2011;76:456-462.
70. Borille WMA, Reissmann BC, De Freitas SJR. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *B. Ceppa*. 2005; 23:183-198.
71. Bortoluzzi ALM, Pasqualatto RPR, Guesser G, Cardozo Jr EL, Donaduzzi CM, Mitsui M 2006. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). 4º Congresso Sudamericano de la Yerba Mate - 4º Reunión Técnica de la Yerba Mate; 2º Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate. Posadas, Argentina
72. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven south American *Ilex paraguariensis*. *Fitoterapia*. 2001; 72:774-778.
73. Gnoatto SCB, Bassani VL, Coelho GC, Schenkel EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae). *Quim Nova*. 2007; 2: 304-307.

74. Reissmann CB, Carneiro C. Crescimento e composição química de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), transcorridos oito anos de calagem. *Floresta*. 2004; 34: 381-386.
75. Asolini FC, Tedesco AM, Carpes ST, Ferraz C, Alencar SM. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Braz J Food Technol*. 2006; 9: 209-215
76. Bromatos SL 2000. *Fitoterapia: Vademecum de Prescripción. Plantas Medicinales*. 3.ed. Barcelona: Masson
77. Girolometto G, Avancini CAM, Carvalho, HHC, Wiest JM. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). *Rev. Bras. Pl. Med*. 2009;11(1):49-55.
78. López de Bocanera ME, Koss de Stisman MA, Bru de Labanda E, Chervonagura de Gepner A. Statistical analysis of salivary pH changes after the intake of black tea and yerba mate supplemented with sweeteners. *J. Oral Sci*. 1999; 41(2):81-85.
79. Burris K, Harte F, Davidson M, Stewart N, Zivanovic S. Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. *Chilean J. of Agricultural R*. 2012;72(2).
80. Burris KP, Davidson PM, Stewart Jr CN, Harte FM. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*. 2011;76:456–462.
81. Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias Filho BP, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn*. 2003; 13: 21-24.
82. Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Rev Saude Publ*. 2004; 38: 326- 328.
83. Aguiar JS, Costa M CCD, Nascimento SC, Sena KXFR. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18: 436- 440.
84. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18: 670-675
85. Salvagnini LE, Oliveira JRS, Santos LE, Moreira RRD, Pietro RCLR. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18: 241-244.
86. Bertucci A, Olivaro C, Silva PA, Ramos D, Cerdeiras MP, Vázquez A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. *Rev Bras Farmacogn*. 2009; 19: 20
87. Silva Junior IF, Cechinel Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19: 242-248.

88. Lückemeyer, D. D., Müller, V. D., Moritz, M. I. G., Stoco, P. H., Schenkel, E. P., Barardi, C. R., Simões, C. M. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. *Phytotherapy Research*. 2012; 26(4), 535-540.
89. Giordani C, Santin R, Cleff M. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-Candida no período de 2005-2013. *Rev. bras. plantas med.* 2015; 17(1): 175-185.
90. De Biasi B, Grazziotin Neiva A, Hofmann JR, Arno E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. *Rev. bras. farmacogn.* 2009; 19(2b):582-585.
91. Godoy J, Bonfim-Mendonça PS, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Pieralisi N et al. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *J Oral Pathol Med* 2012.

II. ARTIGO CIENTÍFICO

***In vitro* activity of extract from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) against *Candida* spp.**

Mayra Leticia Fretes Corrales^a, Janine Silva Ribeiro Godoy^b, Mariana Nascimento^c, Admilson Gonçalves de Oliveira Júnior^d, João Carlos Palazzo de Mello^c, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^b, André Gasparetto^a.

^a Department of Dentistry, State University of Maringá, Av. Mandacaru 1.550, Maringá, Paraná, Brazil, BR- 87080-000

^b Section of Medical Mycology, Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, bloco T20 sala 11, Maringá, Paraná, Brazil, BR- 87020-900

^c Departament of Pharmacy, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá, Paraná, Brazil, BR - 87020-900

^d Department of Microbiology, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Londrina, Paraná, Brazil, BR – 86057-970

Corresponding author:

André Gasparetto

Universidade Estadual de Maringá, Av. Mandacaru 1.550, Maringá, Paraná, Brazil, ZIP Code: 87080-000. Telephone: +55 44 91031441, Fax: +055 44 30319051.

E-mail address: agaspare@uol.com.br (André Gasparetto)

*Artigo formatado conforme normas de publicação do periódico científico **Archives of Oral Biology** (Anexo A)

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar o efeito de extratos vegetais de *Ilex* coletados de ambientes com maior e menor exposição ao sol, frente à *Candida albicans* e *Candida não Candida albicans* (CNCA), bem como avaliar o impacto destes sobre a virulência.

MATERIAIS E MÉTODOS: Os extratos de ILEX foram obtidos a partir de diferentes líquidos extratores. O teste de susceptibilidade foi usado como triagem para seleção de duas cepas e dois extratos para as demais avaliações. A partir destes resultados foi avaliado o perfil de hidrofobicidade, adesão em superfície de resina acrílica, adesão em células epiteliais bucais, e formação de biofilme, bem como o perfil cromatográfico.

RESULTADOS: Os resultados evidenciaram que os extratos de ILEX exibiram comportamentos relevantes frente *C. albicans* e *C. krusei* diante de alguns atributos de virulência avaliados. No teste de hidrofobicidade foi observada, uma mudança para o perfil hidrofílico, tanto em *C. albicans* como em *C. krusei*, o que pode ser notado pela diminuição na formação de biofilme em 24 h, mas não relacionada à adesão em resina acrílica. Por outro lado, o processo de adesão em células epiteliais bucais (CEB) por *C. albicans*, mostrou redução não significativa na capacidade em aderir. O perfil cromatográfico mostrou a presença de cafeína e ácido clorogênico como substâncias majoritárias em todos os extratos preparados.

CONCLUSÃO: Este estudo mostrou que extratos de ILEX, tiveram efeito antimicrobiano frente às espécies *C. albicans* e *C. krusei*, e sobre a virulência, reduzindo a capacidade de formar biofilme relacionado a alterações na superfície celular, indicando uma possível ação de prevenção contra candidoses orais. Assim, *Ilex paraguariensis* pode ser uma fonte de pesquisa com potencial para novos agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, *Candida* spp., fatores de virulência, resina acrílica

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the effect of *Ilex* extracts collected from environments with greater and lesser exposure to the sun, compared to *Candida albicans* and *Candida non Candida albicans* (CNCA), as well as to evaluate their impact on virulence.

MATERIALS AND METHODS: ILEX extracts were obtained from different extractive liquids. The susceptibility test was used as screening for selection of two strains and two extracts for the other evaluations. From these results the profile of hydrophobicity, surface adhesion of acrylic resin, adhesion in buccal epithelial cells, and biofilm formation, as well as the chromatographic profile, were evaluated.

RESULTS: The results showed that the extracts of ILEX exhibited relevant behaviors against *C. albicans* and *C. krusei* due to some virulence attributes evaluated. In the hydrophobicity test, a change to the hydrophilic profile was observed in both *C. albicans* and *C. krusei*, which can be noticed by the decrease in biofilm formation in 24 h but not related to the adhesion in acrylic resin. On the other hand, the process of adhesion in oral epithelial cells (CEB) by *C. albicans*, showed a non-significant reduction in the ability to adhere. The chromatographic profile showed the presence of caffeine and chlorogenic acid as major substances in all prepared extracts.

CONCLUSION: This study showed that extracts of ILEX had an antimicrobial effect against *C. albicans* and *C. krusei* species, and on virulence, reducing the ability to form biofilm related to changes in the cell surface, indicating a possible prevention action against candidoses Oral. Thus, *Ilex paraguariensis* may be a research source with potential for new antimicrobial agents.

Key words: *Ilex paraguariensis*, erva-mate, *Candida* spp., Virulence factors, acrylic resin

1. Introdução

Ilex paraguariensis St. Hil. (Aquifoliaceae), popularmente “erva-mate”, é uma planta subtropical nativa da América do Sul. Ela é utilizada na região Sul da América do Sul, e consumida na forma de infusão ¹⁻³.

Análises da composição de ILEX revelam a presença de polifenóis, xantinas, derivados de cafeína, saponinas, flavonoides e minerais na sua composição ⁴⁻⁷, o que pode conferir propriedades nutritivas e farmacêuticas ⁸⁻¹¹. Ainda, estudos demonstram que a atividade antimicrobiana de extratos de folhas e ramos de ILEX pode sofrer interferência pela exposição ou não ao sol ¹²⁻¹³. No entanto, poucos estudos foram desenvolvidos para investigar a ação antimicrobiana desses extratos contra *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos oportunistas associados a infecções orais ^{14,15}. *C. albicans* é a espécie mais isolada, mas tem havido mudanças nesse perfil com a emergência de *C. Tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *C. krusei*, e com o aumento da resistência fúngica ¹⁶⁻¹⁹.

Embora a suscetibilidade das infecções por *Candida* spp. esteja relacionada com alterações no sistema imunológico e com o desequilíbrio da microbiota, existem fatores de virulência nas leveduras que podem contribuir para a adesão e colonização delas, como habilidade de transição morfológica, hidrofobicidade de superfície celular, capacidade de aderir na mucosa e superfícies inertes, formação de biofilmes, entre outros ²⁰⁻²². A adesão das leveduras às células epiteliais bucais (CEB) é reconhecida como um passo importante na colonização microbiana, e um evento chave na iniciação do processo patogênico ²³. Além deste, outros fatores de virulência como capacidade de formar biofilme, hidrofobicidade da superfície celular (HSC), podem influenciar na gravidade da infecção ²⁴⁻³¹.

Estomatites causadas por *C. albicans* afetam a maioria dos usuários de prótese total, geralmente idosos com higiene bucal deficiente ^{24,27,28,33,34}. A remoção mecânica consiste no melhor método para o seu controle, mas o uso de

coadjuvantes químicos é valioso³⁵. A resistência aos antifúngicos entre as espécies de *Candida* spp. tem sido um problema crescente e já foi detectada em diversos estudos^{36,37}. A aplicação de agentes antissépticos na cavidade bucal, como a clorexidina, deve ser cuidadosamente acompanhada devido a seus efeitos colaterais, apesar do conhecido benefício deste agente³⁸.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de extratos vegetais de *Ilex* coletados de ambientes com maior e menor exposição ao sol, frente à *Candida albicans* e *Candida não Candida albicans* (CNCA), bem como avaliar o impacto destes sobre a virulência.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

As folhas de erva-mate (ILEX) foram fornecidas pela Fábrica Kovalski Indústria de erva-mate Ltda.- Chapecó SC. Após secagem e moagem os extratos foram preparados no Laboratório de Biologia Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. Foram obtidas amostras de dois indivíduos, localizadas em posições diferentes ao sol. Sendo o mais exposto ao sol o indivíduo 1: latitude (S): 27°04' 564'', longitude (W): 52°37' 701. E o menos exposto ao sol o indivíduo 2: latitude (S):27° 09' 564'', longitude (W) 52° 37' 713.

2.2. Perda por secagem das folhas de erva-mate

Para a determinação da perda por secagem, foram pesadas 5 g da folha do vegetal e postas para secar à temperatura ambiente, sem a presença de luminosidade. A pesagem foi realizada diariamente até peso constante (n=5).

2.3. Preparação do extrato bruto de erva-mate

A preparação dos extratos de ILEX foi realizada a partir das folhas de dois indivíduos (I1 e I2) da coleta fornecida pela Fábrica Kovalski Indústria de erva-mate (tabela 1). Os extratos brutos de ILEX foram obtidos a partir das folhas moídas e preparados na proporção 10% (m/v) utilizando como líquido extrator, água fria, água quente, álcool

50, 70 e 96%, em Ultra-turrax® (T-25), durante 20 min, com intervalos de 5 min. Após, os extratos produzidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida ($t < 40$ °C). Em seguida os extratos foram congelados, liofilizados e armazenados em freezer (-20 °C)³⁹. Para cada extrato foi preparado uma solução estoque na concentração de 10 mg/mL, em água destilada estéril. Estas soluções foram avaliadas pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Tabela 1. Extratos de erva-mate preparados com diferentes líquidos extratores a partir dos indivíduos 1 e 2.

Indivíduo 1	Líquido extrator	Indivíduo 2	Líquido extrator
M1	Água fria	M6	Água fria
M2	Água quente	M7	Água quente
M3	Álcool 50%	M8	Álcool 50%
M4	Álcool 70%	M9	Álcool 70%
M5	Álcool 96%	M10	Álcool 96%

2.4. Obtenção das cepas e condições de cultura

As cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida tropicalis* (ATCC 40042), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 40147) foram obtidas do estoque de culturas de leveduras do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

2.5. Preparação das suspensões de leveduras e determinação dos controles

As cepas foram reativadas 24 h antes de cada experimento em caldo YPD (1% yeast extract, 2% peptone e 2% dextrose) dissolvido em água destilada pH 6,5. Depois foram cultivadas por 24 h em ágar YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% ágar). Após estes períodos foram ressuspensas em tampão salina fosfato (PBS) (2,7 mM de KCl e 157 mM de NaCl em 10 mM de tampão fosfato potássio). A concentração de cada inóculo foi ajustada em hemocitômetro tipo Neubauer (Sigma,USA).

Para os ensaios de hidrofobicidade, as amostras foram reativadas em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (Sabouraud Dextrose Broth, Becton Dickinson France) por 24-48 h à 30 °C, e após, cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Agar Sabouraud Dextrose, Becton Dickinson France) por mais 24 h à 35 °C. Em todos os ensaios, as leveduras foram utilizadas com 24 h de crescimento após seu cultivo.

Foram utilizados como controles, solução de clorexidina na concentração final de 0,125% (digluconato de clorexidina 2%, FGM, Brazil) e PBS (tampão salina fosfato (2,7 mM de KCl e 157 mM de NaCl em 10 mM de tampão fosfato potássio).

2.6. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27–A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ⁴⁰, com algumas modificações para produtos naturais. Dez diluições em série dos extratos ILEX foram preparadas a partir de uma concentração de 10 mg/mL e foram testadas contra inóculo (INOC) a 5×10^3 UFC/mL. A solução de clorexidina (CLO) usada como controle foi diluída a partir de uma concentração de 2%. Os ensaios foram feitos em quadruplicata. Este teste foi utilizado como triagem, e a partir de seus resultados foram selecionadas duas cepas *C. albicans* e *C. krusei*, e dois extratos de ILEX, M2 (água quente do I1) e M7 (água quente do I2), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Teste de susceptibilidade dos extratos de erva-mate (ILEX) contra *C. albicans* e CNCA, utilizando cinco extratos de cada indivíduo (I1, I2).

ID	COMPOSTOS	CIM (mg.ml ⁻¹)					
		CA (90028)	CG (2001)	CT (750)	CP (22019)	CK (40147)	
Indivíduo 1	M1	Água fria	-	-	-	5 mg	-
	M2	Água quente	-	0,0098 mg	-	-	-
	M3	Álcool 50%	-	-	5 mg	-	0,6 mg
	M4	Álcool 70%	-	-	-	-	0,6 mg
	M5	Álcool 96%	-	-	-	-	0,6 mg

Indivíduo 2	M6	Água fria	-	0,0098 mg	5 mg	-	-
	M7	Água quente	-	0,0098 mg	-	-	0,3 mg
	M8	Álcool 50%	-	-	5 mg	-	-
	M9	Álcool 70%	-	-	5 mg	-	2,5 mg
	M10	Álcool 96%	-	0,039 mg	-	-	-

Indivíduo 1: mais exposto ao sol

Indivíduo 2: menos exposto ao sol

CA: *Candida albicans*

CG: *Candida glabrata*

CT: *Candida tropicalis*

CP: *Candida parapsilosis*

CK: *Candida krusei*

2.7. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Cada inóculo do teste anterior que não apresentou crescimento e os controles positivos foram subcultivados em placas de SDA, devidamente identificados. Após 24 h de incubação a 35 °C, as leituras das CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM, a menor concentração da droga que impediu crescimento visível do subcultivo.

2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo de alterações morfológicas e de população em *C. albicans* e *C. krusei*, tratadas com extratos de erva-mate (M2 e M7), foi realizado por MEV empregando-se o equipamento FEI Quanta 200 (FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de 10⁶ torr. Após o tratamento nas concentrações de 625 µl, as amostras foram incubadas por 60 min, 37 °C sob agitação. Em seguida, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2 e mantidas à temperatura de 4 °C por 24 h. Após a fixação primária, as amostras foram pós-fixadas em OsO₄ 1% por 1 h. O material fixado foi desidratado em um gradiente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100 °GL) e secas ao ponto crítico utilizando CO₂ líquido (BALTEC CPD 030, Critical Point Dryer, Alemanha). Em seguida, as amostras foram montadas em suportes de alumínio com fita de carbono, pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Alemanha) e observadas em microscópio eletrônico de varredura. As eletromicrografias foram geradas em modo topográficos (elétrons secundários) a 30 kV.

2.9. Determinação da hidrofobicidade de superfície celular (HSC)

A HSC foi determinada pelo Teste de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH) com algumas modificações^{41,42}.

Em tubos de vidro foram adicionados o inóculo (INOC) (350 µL; 1- 2×10⁵ UFC/ mL) mais extrato de ILEX (350 µL; concentração final a 10 mg/mL); ou solução de CLO (350 µL; concentração final a 1,125%); ou PBS (350 µL). Na sequência, 100 µL foram transferidos da suspensão de cada tubo, para uma microplaca de 96 poços (Nunclon, Denmark) e foi realizada uma leitura inicial por densidade ótica (DO) a 0,5 em 620 nm em leitora de microplaca (Expert plus – ASYS,UK). Para cada um dos três tubos de vidro contendo a suspensão restante (600 µL), foram adicionados 150 µL de *n*-hexadecano (Sigma, EUA). Cada tubo foi agitado por 3 min em agitador de tubos (Vortex AP 56- Phoenix Brasil) para que todas as leveduras entrassem em contato com a parte hidrofílica e hidrofóbica. Os tubos foram deixados em repouso por 15 min, para que ocorresse a separação de fases. Foram pipetados 100 µL da fase aquosa de cada tubo para outra microplaca. Foi realizada a segunda leitura (final) da DO sob as mesmas condições. Os testes foram feitos em triplicata e tubos sem leveduras foram utilizados como controle. A porcentagem de HSC foi dada através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{LEITURA FINAL}}{\text{LEITURA INICIAL}} \times 100 = \dots\dots\dots\%$$

Interpretação: Valores E<50% foi considerada hidrofóbica (Ho); E>50% = hidrofílica (Hi).

2.10. Formação de biofilme

A capacidade de produzir biofilme foi avaliada segundo a metodologia de Shin et al. (2000)⁴³ com algumas modificações. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços, em triplicata, foi adicionado o inóculo (20 µL; 1- 2×10⁷) suplementado com 160 µL de SDB glicosado (8% glicose) mais ILEX (20 µL); ou CLO (20 µL); ou PBS (20 µL). A microplaca foi incubada por 24 h a 37 °C sob agitação contínua a 50 rpm (Shaker NT 712).

Em seguida foram realizadas duas lavagens com água destilada e leitura na leitora de microplacas a 405 nm (Expert plus - ASYS, UK). Para quantificar o biofilme foi subtraído o valor da DO convertido em transmitância (T) do valor do controle negativo (sem produção de biofilme) e seguiu a seguinte escala de interpretação: negativo (% T < 5), 1 + (%T 5 a 20), 2 + (% T 20 a 35), 3 + (% T 34 a 50), 4 + (% T ≥ 50).

2.11. Adesão em superfície de resina acrílica

O ensaio de adesão sobre superfície de resina acrílica foi realizado de acordo a técnica de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), proposta por Samaranyake e McFarlane (1980)³² com adaptações.

Foram confeccionados corpos de prova em resina acrílica termopolimerizável de 5x5 mm, fabricados com uma lâmina de cera (Epoxyglass, Brasil). As lâminas foram inseridas em gesso pedra tipo III (Herodent Soli-Rock; Vigodent, Brasil), utilizando uma mufla (Uraby; DLC, Brasil), para polimerização pelo calor. Depois do gesso ser fixado completamente, as muflas foram fervidas durante 5 min para amolecer e eliminar a cera. A resina acrílica foi embalada e seguiu-se as recomendações do fabricante para polimerização com banho-maria. Depois do ciclo de polimerização, todas as amostras receberam o mesmo tratamento de acabamento e polimento. Estes foram polidos usando papéis de óxido de alumínio (220-320, e 400-grit, sequencialmente). Para polimento mecânico, uma roda de escova (TMP-200; Equilam, Brasil), com pasta de pedra-pomes e um cone de feltro com pó de giz (Branco-Rio, Brasil) foram utilizados. Todas as amostras foram polidas pelo mesmo operador e expostos aos mesmos procedimentos, como cada passo de polimento mecânico foi realizada durante 1 min em cada superfície. Todos os espécimes foram imersos em água destilada a 37 °C por 12 h para a liberação de monômero residual. Foram confeccionados três corpos de prova para cada grupo avaliado.

Os corpos de prova foram esterilizados e hidratados com água destilada, e foram colocados em poços de microplaca de 24 poços (Nunclon, Delta, Denmark). Em cada poço, além do corpo de prova foi adicionado o INOC (500 µL; $1-2 \times 10^5$) mais ILEX (500 µL), ou CLOR (500 µL) ou PBS (500 µL).

As microplacas foram incubadas por 60 min a 37 °C sob agitação contínua a 50 rpm. Em seguida, os corpos de prova foram lavados três vezes com PBS para remoção de micro-organismos fracamente aderidos ou não aderidos, e transferidos para tubos de ensaio de vidro com PBS (2 mL) e pérolas de vidro (1 g) (1-2 mm de diâmetro, Roni Alzi Scientific Glass). Foram agitadas durante 1 min em agitador de tubos para despreendimento das leveduras fortemente aderidas às superfícies da resina. Desta suspensão foi feita a inoculação em placas de Petri contendo SDA. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h e em seguida foi realizada a contagem visual do número de colônias. Os valores foram expressos pela média de células de *Candida* spp. aderidas por mm².

2.12. Adesão em Células Epiteliais Bucais (CEB)

C. albicans foi cultivada em Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco, USA) suplementada com 50 mM de galactose e incubada a 37 °C por 24 h. Em seguida, lavada três vezes em PBS e ressuspensa no mesmo tampão para obtenção e ajuste do inóculo.

Foram coletadas CEB da mucosa bucal de uma voluntária saudável e depositadas em tubo de ensaio contendo 10 mL de PBS. Essa suspensão foi lavada três vezes em PBS por centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O sedimento obtido foi ressuspensa em PBS para obtenção e ajuste da suspensão de CEB, segundo Irie et al. (2006)²¹.

Em tubos de ensaio de plástico foram adicionados à suspensão de CEB (500 µL; 10⁵ cél/mL) e o INOC (250 µL; 1-2×10⁵) mais ILEX (250 µL), ou CLO (250 µL), ou PBS (250 µL). Em seguida, os tubos foram incubados por 1 h a 37 °C em agitação contínua à 70 rpm. As células da suspensão foram então, lavadas cinco vezes com PBS por centrifugação a 3000 rpm por 10 min, obtendo-se um sedimento de CEB com ou sem leveduras aderidas e preparadas sobre lâminas de vidro. Foram fixadas com cristal violeta e coradas pela técnica de Papanicolau.

A capacidade de adesão foi analisada em microscópio óptico (Nikon®), 400X). A avaliação foi realizada por uma única examinadora, em campos microscópicos sem sobreposição de CEB ou artefatos de coloração. Foram consideradas aderidas as leveduras que apresentam nítida interação com as CEB, evidenciadas por um halo

claro ao seu redor. Foram realizadas duas contagens independentes. Primeiro, foram contadas quantas leveduras aderiram às CEB, onde foi obtida a porcentagem de células que tiveram leveduras aderidas e depois foram contadas quantas leveduras aderiram a cada célula, obtendo o número médio de leveduras aderidas por célula. Todos os resultados foram expressos pelos valores médios entre as repetições de cada ensaio.

2.13. Cromatografia líquida alta eficiência (CLAE)

Foram realizadas análises para a determinação do perfil cromatográfico dos extratos aquosos M2 e M7 utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV/Vis. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna C18 (Coluna Onyx Monolithic 100x4,6 mm), com partículas de 5 micrômetros. Como fase móvel foi utilizado água e ácido fórmico (pH 2,5) como solvente A, e acetonitrila e ácido fórmico (pH 2,5) como solvente B. Para as análises foi utilizado o gradiente: 0-3 min 20%B; 3-8 min 25%B; 8-15 min 27%B; 15-20 min 28%B; 20-25 min 29%B; 25-30 min 32%B; 30-35 100%B; 35-37 min 100%B. A coluna foi estabilizada à 28 °C, e a leitura no UV/Vis foi realizada no comprimento de onda de 280 nm. As soluções das amostras M2 e M7 foram preparadas numa concentração de 1 mg/mL e filtradas em filtro de poro de 0,5 micron (seringa para injeção no sistema de 20 µL) ⁴⁴. Para a curva de calibração foram preparadas concentrações de 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 mg/mL dos padrões de cafeína e ácido clorogênico, obtendo-se as concentrações destas substâncias nas amostras M2 e M7.

2.14. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) substâncias puras em cafeína e ácido clorogênico

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27–A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ⁴⁰, com algumas modificações para produtos naturais. Dez diluições em série das substâncias cafeína (C), ácido clorogênico (AC), e suas misturas nas proporções de: C 4:1 de AC e C 1,7:1 AC, foram preparadas a partir de uma concentração de 10 mg/mL e foram testadas contra inóculo (INOC) a 5×10^3 UFC/mL. Os ensaios foram feitos em quadruplicata

2.15. Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA e teste Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância foi fixado em 5% e os testes foram feitos pelo GraphPad Prism 6, versão 6.01.

3. Resultados

3.1. Concentração inibitória mínima (CIM)

As atividades antimicrobianas dos extratos de ILEX diluídas em água estão dispostas na tabela 3. O extrato M7 inibiu o crescimento de *C. krusei* na concentração de 0,3 mg, não ocorrendo o mesmo resultado com o extrato M2, que são diferentes em apenas a disposição da planta a exposição do sol. Em relação a *C. albicans* houve crescimento nos dois extratos testados. A CLO utilizada como controle, inibiu o crescimento de leveduras na concentração de 0,125%.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima dos extratos M2 e M7 de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

ID	Compostos Líquido extrator	MIC (mg.mL ⁻¹)	
		CA (90028)	CK (40147)
M2	Água quente	-	-
M7	Água quente	-	0,3 mg

3.2. Microscopia eletrônica de varredura, análise em *C. albicans* e *C. krusei*.

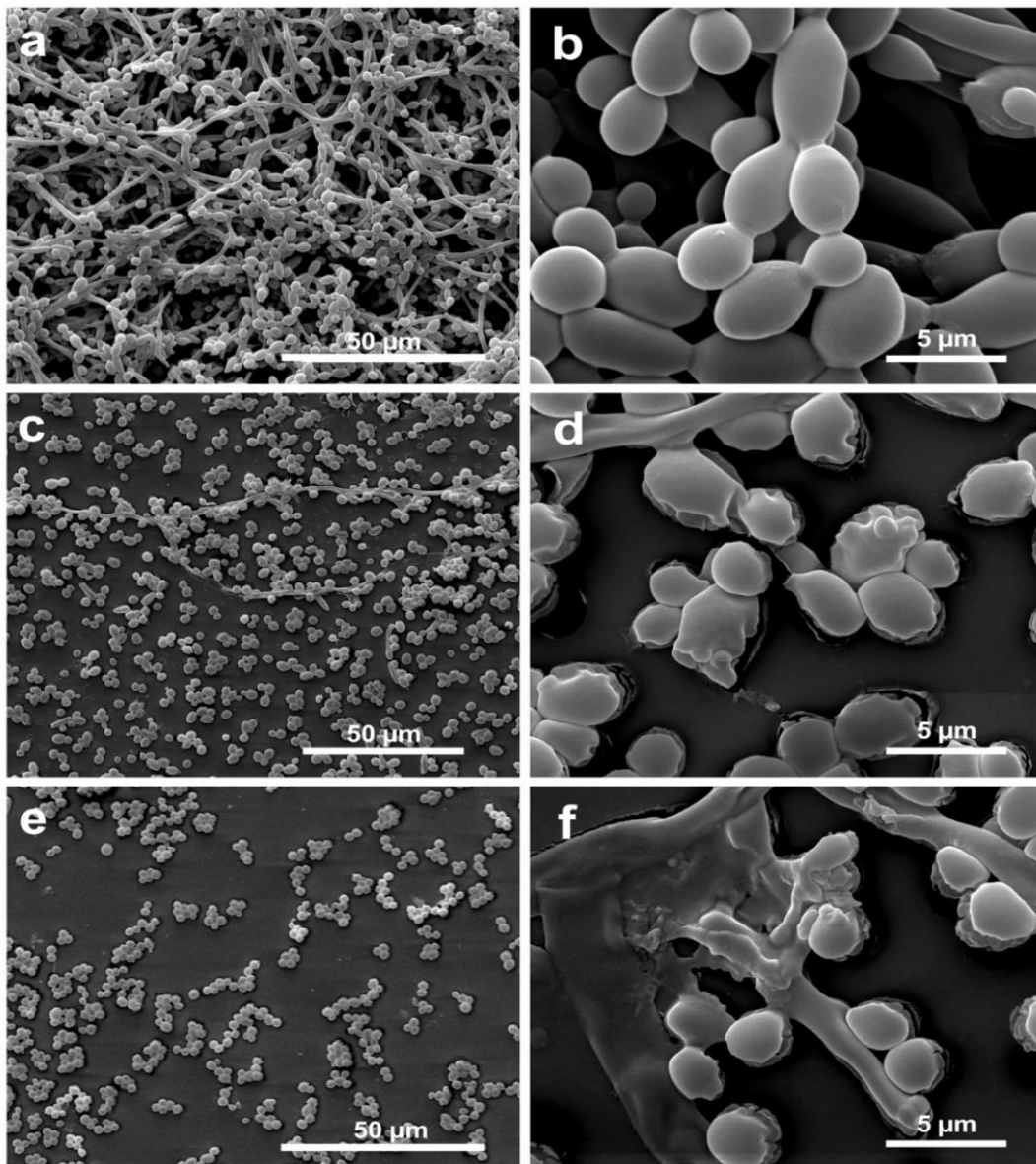
Candida albicans

Figura 1. Eletromicrografias obtidas em MEV de *C. albicans* tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 μg/mL. **a:** *C. albicans* não tratada (controle) em 1600 x. **b:** *C. albicans* não tratada (controle) em 12000 x. **c:** *C. albicans* tratada com o extrato M2 em 1600 x. **d:** *C. albicans* tratada com o extrato M2 em 12000 x. **e:** *C. albicans* tratada com o extrato M7 em 1600 x. **f:** *C. albicans* tratada com o extrato M7 em 12000 x.

Candida krusei

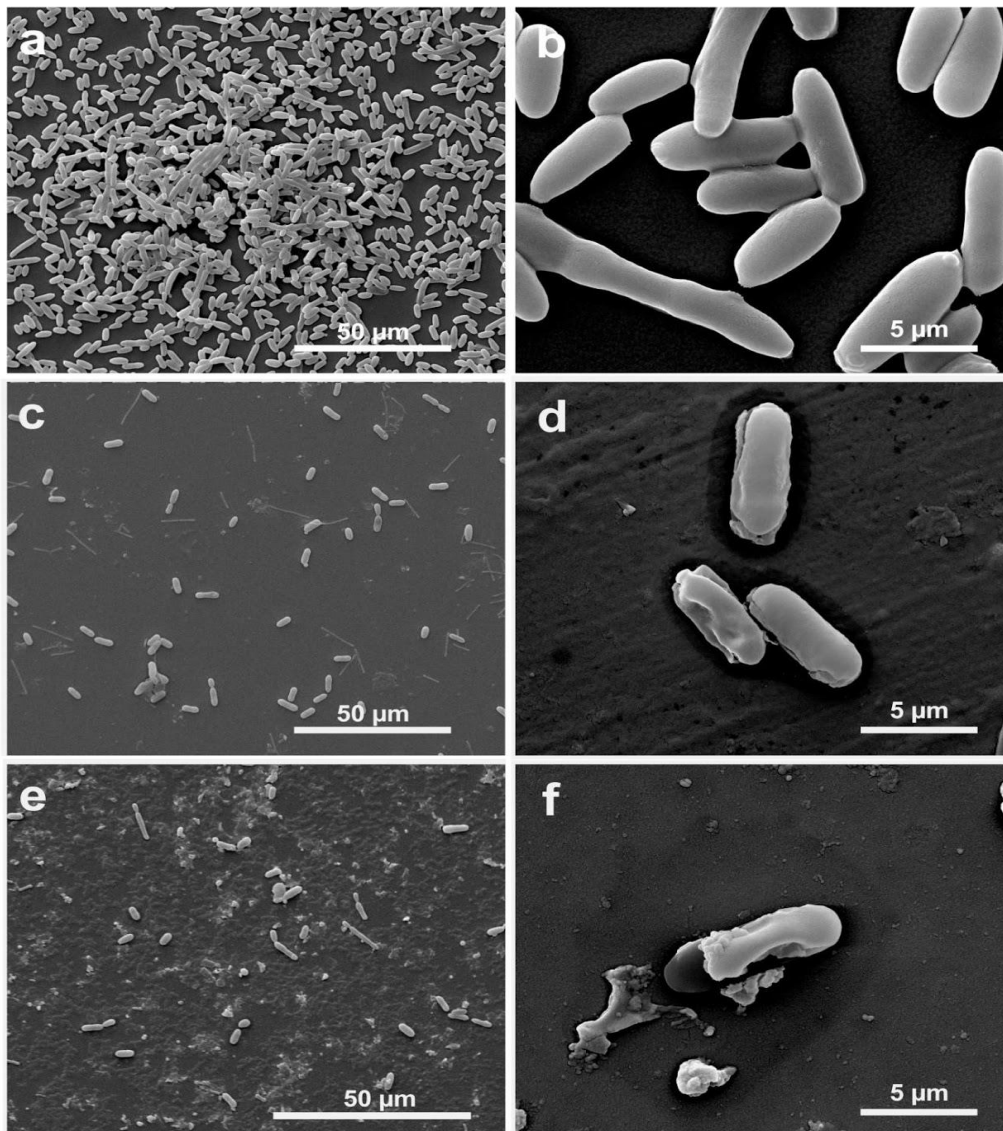


Figura 2. Eletromicrografias obtidas em MEV de *C. krusei* tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. **a:** *C. krusei* não tratada (controle) em 1600 x. **b:** *C. krusei* não tratada (controle) em 12000 x. **c:** *C. krusei* tratada com o extrato M2 em 1600 x. **d:** *C. krusei* tratada com o extrato M2 em 12000 x. **e:** *C. krusei* tratada com o extrato M7 em 1600 x. **f:** *C. krusei* tratada com o extrato M7 em 12000 x.

3.3. Formação de biofilme

A exposição de *C. albicans* aos extratos de ILEX provocou uma diminuição na capacidade de produzir biofilme em 24 h, (de 4+ para 3+ e 2+). Assim mesmo,

ocorreu uma diminuição em cepas de *C. krusei* (de 3+ para 2+), sendo 4+ a quantidade máxima segundo os escores propostos por Shin³⁴ (Tabela 4).

Tabela 4. Formação de biofilme (Shin, 2002), antes e após exposição dos extratos de erva-mate (ILEX).

	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>
PBS	4+	3+
CLO	3+	2+
M2	2+	2+
M7	3+	2+

3.4. Hidrofobicidade de superfície celular (HSC)

C. krusei apresentou inicialmente um perfil hidrofóbico, que após a exposição aos extratos M2 e M7 diminuiu a porcentagem de células que migraram para o *n*-hexadecano, ou seja, as leveduras se tornaram hidrofílicas, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Por outro lado, *C. albicans* apresentou inicialmente um perfil hidrofílico, que foi mantido, não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,999$), não alterou a porcentagem de células que migraram para o *n*-hexadecano após a exposição aos extratos M2 e M7 de ILEX (Figura 1).

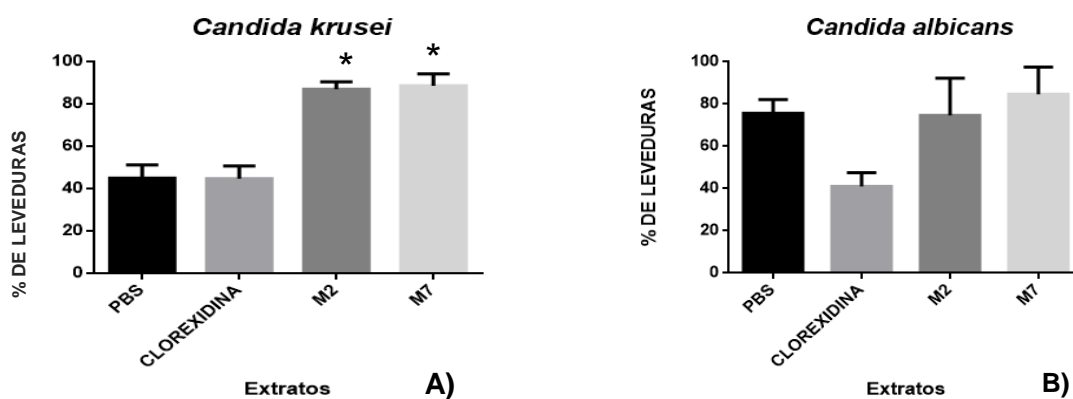


Figura 3. A) Influência do extrato de ILEX sobre *C. krusei* ($p < 0,05$) e **B)** *C. albicans* ($p > 0,05$) considerando o perfil de hidrofobicidade em superfície celular (HSC). Teste Anova.

3.5. Adesão em superfícies de resina acrílica

A exposição de *C. krusei* aos extratos M2 e M7 de ILEX levou a uma redução da adesão da levedura à resina acrílica embora o resultado não seja estatisticamente significativo ($p = 0,999$). Já a exposição de *C. albicans* aos extratos M2 e M7 de erva-

mate não alterou a adesão desta levedura à resina acrílica. Por outro lado, a solução de clorexidina provocou uma diminuição significativa das leveduras à resina acrílica (Figura 2).

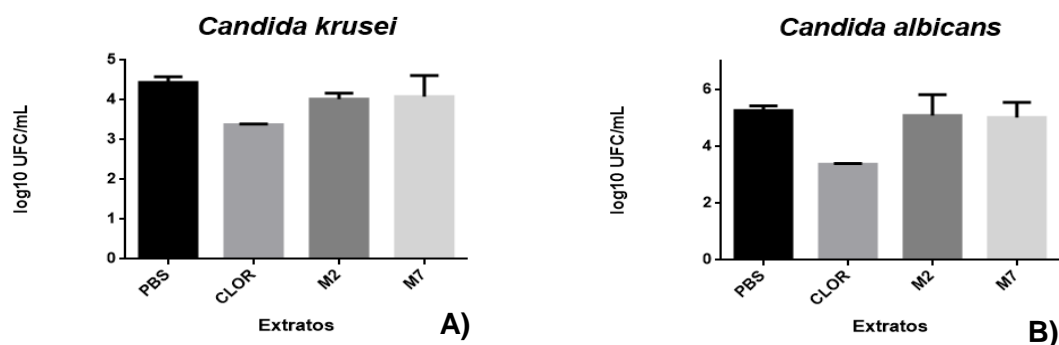


Figura 4. Perfil de adesão de **A)** *C. krusei* e **B)** *C. albicans* sobre superfície de resina acrílica após exposição ao PBS, extrato de ILEX e CLO ($p > 0,05$). Teste Anova.

3.6. Adesão em CEB

Os extratos de ILEX M2 e M7 provocaram uma redução tanto na porcentagem de leveduras aderidas às CEB (de 28 para 21,5 e 24), quanto no número médio de leveduras aderidas por célula (de 2,05 para 1,76 e 1,81) ($p < 0,001$). Visto ao microscópio óptico (MO) foram observadas alterações nas estruturas, e maior filamentação das leveduras aderidas quando expostas aos extratos M2 e M7. Após exposição à solução de CLO houve uma redução significativa na porcentagem de CEB que tiveram leveduras aderidas (de 28 para 9,5) (Tabela 5, Figura 5).

Tabela 5. Perfil de aderência de *C. albicans* sobre células epiteliais bucais, (Teste Tukey).

Perfil de aderência de <i>C. albicans</i> sobre células epiteliais bucais (CEB)			
	%	N°±DP	p
PBS	28	2.05±0.71	P ^{1,2} < 0.0033
CLO	9.5	1.92±0.02	P ^{1,2} <0,0033
M2	21.5	1.76±0.05	P ^{1,3} < 0.0008
M7	24	1.81±0.06	P ^{1,4} <0.0013

Testes de Tukey e ANOVA

% = porcentagem de células que tiveram leveduras aderidas

N° = número médio de leveduras aderidas por célula

DP= desvio padrão

p = valores de p de N°

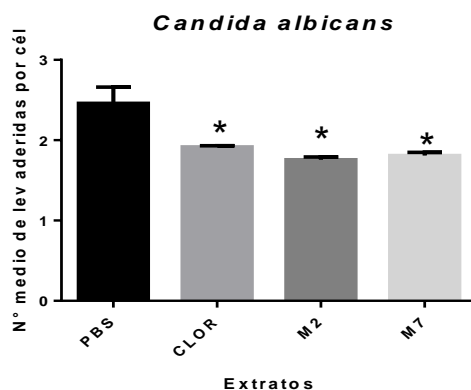


Figura 5. Perfil de aderência de *C. albicans* sobre CEB

3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O estudo da composição química dos extratos de ILEX por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentou maior concentração de cafeína (C) e ácido clorogênico (Ac). Assim, a área dos picos para o M2: 28899 de cafeína, 8547,45 de ác. Clorogênico, e para o M7: 34937,92 de cafeína, 4249,99 de ác. clorogênico (Figura 6). Comparando os dois extratos, foi feita a curva de calibração onde foi utilizada a equação da reta dos compostos cafeína e ácido clorogênico, para a obtenção da concentração em cada extrato. O M7 apresentou uma concentração de cafeína de 30.61 $\mu\text{L/mL}$, e o ácido clorogênico 7,67 $\mu\text{L/mL}$ (4:1), e o extrato M2 apresentou uma concentração de 25,55 $\mu\text{L/mL}$ de cafeína e 15,07 $\mu\text{L/mL}$ de ácido clorogênico (1,7:1) (Figura 7).

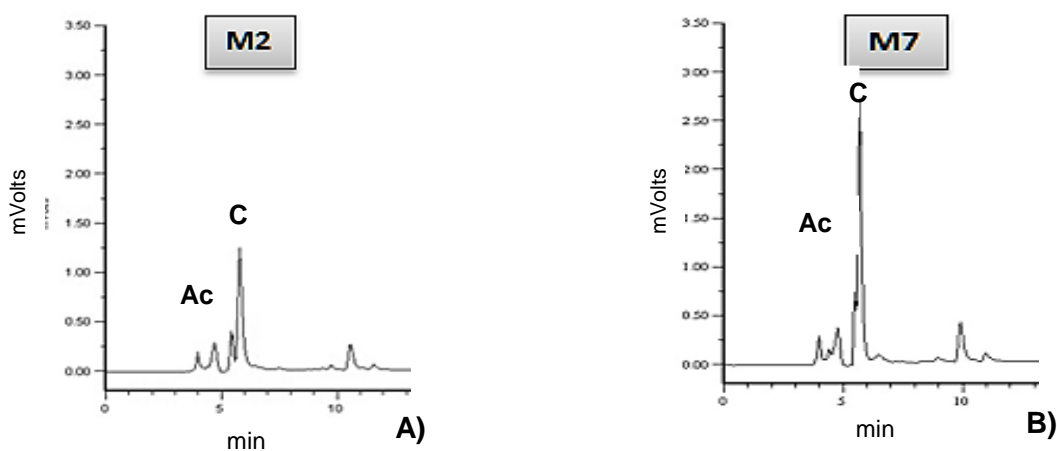


Figura 6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **A)** Extrato M2, proporção de 1,7 de cafeína para 1 de ác. clorogênico e **B)** extrato M7, proporção de 4 de cafeína para 1 de ác. Clorogênico.

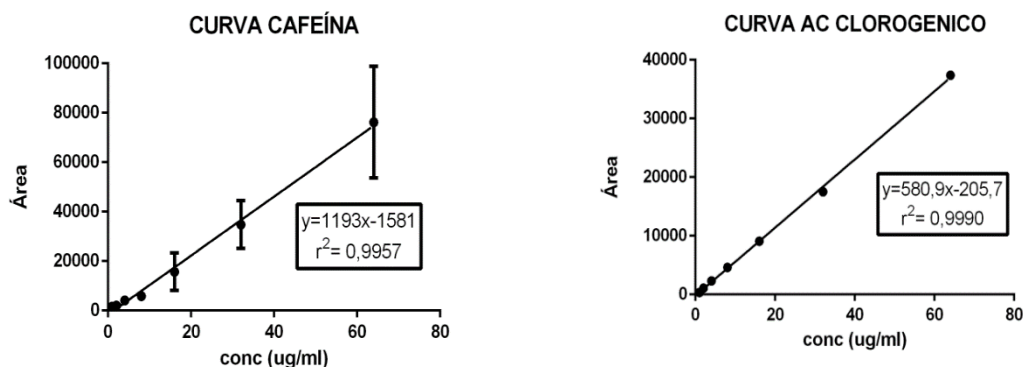


Figura 7. Curva de calibração e equação da reta dos compostos cafeína e ácido clorogênico.

3.8. Concentração inibitória mínima das frações contidas em maior concentração nos extratos selecionados (CIM).

As atividades antimicrobianas dos compostos cafeína, ácido clorogênico e as misturas nas concentrações encontradas no extrato M2 e M7 foram diluídas em água e estão dispostas na tabela 6. A cafeína inibiu o crescimento de *C. albicans* na concentração de 0,6 mg e em *C. krusei* na concentração de 0,3 mg. O ácido clorogênico inibiu o crescimento de *C. krusei* numa concentração de 0,009 mg, não entanto, não inibiu o crescimento em *C. albicans*. Na proporção de 4C:1Ac, os compostos inibiram o crescimento tanto de *C. albicans* como *C. krusei*, ocorrendo o mesmo resultado na proporção de 1,7C:1 Ac. (Tabela 6), porém com maior atividade nesta última.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos: cafeína, ácido clorogênico, e as misturas de 4:1 de cafeína, e 1,7:1 de cafeína, simulando as concentrações das frações encontradas nos extratos M7 e M2 respectivamente

Identificação	CA (90028)	CK (40147)
Cafeína (C)	0.625 mg	0.312 mg
Ácido clorogênico (Ac)	-	0.00976 mg
Proporção de C 4:1 de Ac	0.625 mg	0.156 mg
Proporção de C 1,7:1 de Ac	0.312 mg	0.078 mg

4. Discussão

A incidência de infecções fúngicas por leveduras do gênero *Candida* tem aumentado nos últimos anos, e *C. albicans*, residente da microbiota oral, ainda continua sendo a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos^{30,46}. No entanto, espécies CNCA, tem representado importante emergência nas infecções de origem fúngica¹⁶. O restrito arsenal de antifúngicos disponível, combinado ao aumento na incidência de infecções e desenvolvimento de espécies resistentes, tem-se necessitado a busca por novas estratégias de prevenção e tratamento⁴⁵. Assim o presente estudo avaliou o efeito *in vitro* de ILEX como um possível agente antifúngico, contra seu crescimento e fatores de virulência.

Produtos naturais com atividade contra micro-organismos têm sido descobertos, dentre esses, a *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae), denominada popularmente “erva-mate”, é uma planta subtropical nativa da América do Sul. Ela é utilizada na região Sul da América do Sul, e consumida na forma de infusão¹⁻³. A ILEX tem recebido importante atenção de pesquisadores, por diversas atividades farmacológicas e baixa toxicidade, visto que, é um vegetal de uso rotineiro da população. Assim, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que propõe avaliar o efeito antimicrobiano da ILEX frente aos atributos de virulência de leveduras do gênero *Candida*, embora tenha artigos avaliando o efeito antimicrobiano frente a diversas bactérias e vírus^{10, 12,48-52}.

Nosso primeiro passo foi avaliar a suscetibilidade das espécies do gênero *Candida* aos extratos de ILEX obtidos por diferentes formas de extração. Podemos observar variado perfil, salientando atividades inibitórias frente à CNCA, o que pode ser atribuído a variação da composição química de cada extrato avaliado, influenciado possivelmente pela variação na exposição do sol nos indivíduos 1 e 2. No teste de susceptibilidade aos extratos, obteve-se melhor resultado com o Indivíduo 2 (menor exposição ao sol), na atividade contra *C. krusei*, (tabela 3) levedura que tem demonstrado baixa sensibilidade ao fluconazol⁴⁷. O resultado concorda com o trabalho realizado por de Biasi et al. (2009)¹², utilizando extrato de ramos de ILEX

sem exposição ao sol onde apresentou melhor atividade antifúngica. Vários estudos diferem sobre quais são os compostos que podem contribuir para essa atividade antimicrobiana, mas os principais compostos encontrados incluem o ácido caféico, ácido clorogênico, cafeína, canferol, quercetina, ácido quínico, rutina e teobromina^{6,10}. Outros estudos tem demonstrado que extratos de ILEX possuem principalmente altos níveis de polifenóis (ac. clorogênico) e xantinas (cafeína e teobromina)^{5,6}. O que concorda com o teste CLAE feito neste trabalho, demonstrando maior concentração de cafeína e ácido clorogênico. Sung Lee et al (2010)⁶¹, sugeriu que o ácido clorogênico pode exercer atividade antifúngica frente a determinadas leveduras patogênicas ao interromper a estrutura da membrana celular sem qualquer efeito hemolítico nos eritrócitos humanos. Igualmente no trabalho realizado por de Lee et al. (2008)⁵⁸, o ácido clorogênico também inibiu o crescimento de *C. albicans*. No teste de susceptibilidade aos compostos de cafeína, ácido clorogênico, e as misturas desses compostos nas proporções de 1,7C:1Ac e 4C:1Ac, demonstraram um efeito antimicrobiano frente *C. albicans* e *C. krusei* em diferentes concentrações. Obtendo melhores resultados com o ácido clorogênico. Os três principais compostos: cafeína, ácido ursólico e ácido clorogênico encontrados por Kubo et al (1993)⁵⁹ em ILEX, não demonstraram atividade frente a bactérias G+ e G- na concentração de 400ug/mL. Outro trabalho realizado por Puupponen-Pimia et al (2001)⁶⁰ demonstrou que a cafeína e ácido clorogênico na forma pura apresentaram atividade contra bactéria G-.

De Biasi et al. (2009)¹², avaliaram a atividade antimicrobiana das folhas e ramos de ILEX contra micro-organismos, incluindo *C. albicans*. A técnica utilizada foi de difusão de disco em concentrações de 50 e 100 mg/mL, e demonstrou atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. Neste estudo os extratos de ILEX não apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans* na concentração de 10 mg/mL, o que poderia ser explicado pela utilização de baixa concentração. No entanto, os mesmos extratos utilizados apresentaram atividade contra *C. krusei*. Além disso, na MEV pode-se observar que as leveduras *C. albicans* e *C. krusei* em contato com os extratos, sofreram uma alteração significativa na estrutura, mesmo não atuando como fungicida, pode-se dizer que os extratos testados ocasionaram algum efeito nas leveduras (figura 1 e 2). Girolometto et al. (2009)⁵¹ avaliando

diferentes métodos para extração de princípios ativos de ILEX, verificaram que independente do micro-organismo testado, a alcoolatura (folhas verdes em etanol absoluto) apresentou melhor atividade antibacteriana. No entanto, comparando com o presente estudo utilizando diferentes líquidos extratores não apresentou variação em relação ao álcool na atividade antimicrobiana.

O processo de adesão de *C. albicans* é complexo e envolve fatores biológicos e não biológicos. Variações na superfície das leveduras exercem um papel crítico no processo de adesão²⁴. Além disso, fatores como higiene bucal deficiente, baixo pH na cavidade bucal, dieta rica em carboidratos, superfície da célula fúngica constituída principalmente de nanoproteínas e β -glicanos, hidrofobicidade de superfície celular, a energia livre de superfície do substrato envolvendo forças eletrostáticas de atração e repulsão, a rugosidade da superfície da resina acrílica interferem na adesão e colonização por *C. albicans*.^{14,24,26,28,29}

No presente trabalho, tanto em *C. albicans* quanto *C. krusei* no teste de HSC apresentou uma redução na HSC, sugerindo uma baixa afinidade por superfícies abióticas. O que difere do comportamento do guaraná.⁵³, onde houve um aumento da HSC em *C. albicans*. A HSC contribui para interações hidrofóbicas entre as células e as superfícies, por esse motivo é considerada um fator importante para a adesão de *C. albicans* a superfícies inertes⁵⁴. Panagoda et al.⁵⁵, encontraram correlação estatisticamente significativa entre HSC e a adesão de *C. albicans* nas CEB e nas superfícies de resina acrílica.

A formação de biofilme, após exposição aos extratos de erva-mate frente à *C. albicans* e *C. krusei*, provocou uma diminuição na capacidade de produzir biofilme em 24 h relacionada a alterações evidentes na superfície celular, o qual pode-se observar na microscopia eletrônica de varredura. Neste estudo não encontramos uma correlação do teste de HSC com adesão de leveduras de *C. albicans* à CEB, o que concorda com o trabalho de Gasparetto et al (2004)⁵⁶, demonstrando que a HSC sozinha não é suficiente para a atividade de adesão.

Existem poucos estudos sobre atividade antimicrobiana de extratos de erva-mate contra *Candida* spp. porém a ampliação de estudos são necessários. No entanto, a

descoberta de plantas com potencial terapêutico torna-se cada vez mais importante, pois há necessidade de novos compostos com potencial antimicrobiano. Levando em consideração os resultados deste estudo sugere-se que novos estudos sejam realizados com extratos de erva-mate.

5. Conclusão:

Este estudo mostrou que extratos de ILEX apresentaram efeito antimicrobiano frente espécies de *C. albicans* e *C. krusei*, assim como nos principais atributos de virulência, reduzindo a capacidade de formar biofilme relacionado a alterações evidentes na superfície celular. Indicando uma possível ação de prevenção contra candidoses orais. Assim, *Ilex paraguariensis* é uma fonte de pesquisa para novos agentes antimicrobianos naturais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à fábrica Kovalski Indústria de erva-mate Ltda-Chapecó, SC pelo fornecimento do material vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Alikaridis F. Natural constituents of *Ilex paraguariensis*. J. Ethnopharmacol. 1987; 20: 121-144.
2. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Paris: Technique et Documentation. 1993.
3. Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva Oliveira D. Caracterização físico-química da erva-mate: influencia das etapas do processamento industrial. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. 2002;22(2):193-204.
4. Gosmann G, Schenkel EP. A new saponin from Mate, *Ilex-Paraguariensis*. J Nat Prod. 1989; 52(6)1367-1370.
5. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven south American *Ilex paraguariensis*. Fitoterapia. 2001; 72:774-778.
6. Heck CI, De Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. Journal of Food Science. 2007; 72:138–151.
7. Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*. 2009; 113(4):1370-1376.
8. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. Journal of ethnopharmacology. 2011;136(3): 378-384.
9. Asolini FC, Tedesco AM, Carpes ST, Ferraz C, Alencar SM. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. Braz J Food Technol. 2009; 9:209-215
10. Burris KP, Davidson PM, Stewart Jr CN, Harte FM. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science. 2011; 76:456–462.
11. Gonçalves, A. L., A. Alves Filho, and H. Menezes. "Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas." Arquivos do Instituto Biológico. 2005;72(3): 353-358.
12. De Biasi B, Grazziotin Neiva A, Hofmann JR, Arno E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. Rev. bras. farmacogn. 2009; 19(2b):582-585
13. Jacques RA, Arruda EJ, Oliveira LCS, Oliveira AP, Dariva C, Oliveira JV, Caramão EB. Influence of agronomic variables on the macronutrient and

- micronutrient content and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2007;55:7510-7516.
- 14.Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007;52:1200-8
 - 15.Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis – a brief overview. *Oral Dis* 2008;14:138–43.
 - 16.Galván B, Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Revista iberoamericana de micología*, 2006; 23(1), 12-15.
 - 17.Demitto FDO, Amaral R CRD, Biasi RP, Guilhermetti E, Svidzinski TIE, Baeza LC. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. Em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. *J. bras. patol. med. lab*, 2012 48(5), 315-322.
 - 18.Godoy J, Bonfim-Mendonça PS, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Peralisi N et al. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *J Oral Pathol Med* 2012.
 - 19.Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS* 2002;110:601–10.
 - 20.Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta, RM, Svidzinski TIE. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2005; 159: 501–507.
 - 21.Irie MMT, Consolaro MEL, Guedes TA, Donatti L, Patussi EV, Svidzinski TIE. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J. Clin. Lab. Anal.* 2006; 20(5):195–203.
 - 22.Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008; 14 (7):582–90.
 - 23.Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Fuller SG Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect. Immun.* 2002; 70:5256-5258.
 - 24.He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses* 2006;49:80-4.
 - 25.Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003;11(1):30-6.
 - 26.Elguezabal N, Maza JL, Dorronsoro S, Pontón J. Whole saliva has a dual role on the adherence of *Candida albicans* to polymethylmetacrylate. *Open Dent J* 2008;2:1-4.

27. Souza RD, Mores AU, Cavalca L, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. *Gerodontology* 2009;26:157-61.
28. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS* 1998;106:736-42.
29. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; 44:29-35.
30. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS* 1995;103:707-13.
31. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* 1985;47:11-4.
32. Samaranayake LP, MacFarlane TW. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980;25:603-9.
33. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Rosentritt M, Handel G, Hahnel S. *Candida albicans* adhesion to composite resin materials. *Clin Oral Invest* 2009;13:293-99.
34. Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil* 2007;34:448-55.
35. Jardim Júnior EG, Pedrini D, Xavier EA, Jardim PS. Eficácia do listerine sobre a placa. *Revista Gaúcha Odontológica*. 1998; 46: 70-78.
36. Matta DAD, Almeida LPD, Machado AM., Azevedo AC, Ura Kusano EJ, Travassos NF, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007.
37. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheenan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(2):435-447.
38. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels *Intern Endodont J* 2010;43:430-5.
39. Pessuto, MÔNICA BORDIN. "Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante." *Análise*

- fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante (2006).
40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 41. Pereira T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont* 2007; 20:308–10.
 42. Serrano-Granger C, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Del Rio-Highsmith J. In vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic resins: relationship to surface energy. *Int J Prosthodont* 2005;18:392–8.
 43. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002;40:1244-8
 44. Martucci MEP, De Vos RCH, Carollo CA, Gobbo-Neto L. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus *Vernonia* Schreb. *PLoS One*. 2014; 9(4), 9314-9.
 45. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann, AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(4), 1298-1302.
 46. Silva CRG, Melo KE, Leão MVP, Ruis R, Jorge AOC. Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(6): 300-5.
 47. Swinne D, Watelle M, Van Der Flaes M, Nolard N. “In vitro activities of voriconazole (UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-albicans bloodstream yeast isolates (CANARI study),” *Mycoses*. 2004; 47 (5-6), 177–183.
 48. Filip R, Davicino R, Anesini C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. *Phytotherapy Research*. 2010; 24(5): 715-719.
 49. Lückemeyer DD, Müller VD, Moritz MIG, Stoco PH, Schenkel EP, Barardi CR, Simões CM. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.(yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. *Phytotherapy Research*. 2012; 26(4):535-540.
 50. Carelli G, Macedo SMD, Valduga AT, Corazza ML, Oliveira JV, Franceschi E, et al. Preliminary evaluation of the antimicrobial activity of “erva mate” (*Ilex*

- paraguariensis* A. St. - Hil.) extract obtained by using supercritical CO₂. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 201;13(1):110–5.
51. Girolometto G, Avancini CAM, Carvalho, HHC, Wiest JM. Atividade antibacteriana de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2009;11(1):49-55.
 52. Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias Filho BP, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn.* 2003; 13: 21-24.
 53. Matsuura E, Godoy JSR, de Souza Bonfim-Mendonça P, de Mello JCP, Svidzinski TIE, Gasparetto A, Maciel SM. In vitro effect of *Paullinia cupana* (guaraná) on hydrophobicity, biofilm formation, and adhesion of *Candida albicans* to polystyrene, composites, and buccal epithelial cells. *Archives of oral biology.* 2015;60(3), 471-478.
 54. Klotz SA. The contribution of electrostatic forces to the process of adherence of *Candida albicans* yeast cells to substrates. *FEMS Microbiol Lett* 1994;120(3):257-62.
 55. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranyake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *APMIS* 1998;106:736–42
 56. Gasparetto A. Virulência de amostras orais de *Candida albicans*: novas abordagens metodológicas no estudo da produção de exoenzima na aderência, formação de biofilme e influência de campos magnéticos. Instituto de ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2004.
 57. Luz ABG, Blum-Silva CH, Nascimento MVPS, Facchin BMC, Baratto B, Fröde TS, Reginatto FH, Dalmarco EM. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. *Int. Immunopharmacol.* 2016;36(1):165–172
 58. Lee JH, Park JH, Kim YS, Han Y. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International immunopharmacology.* 2008; 8(12):1681-1685.
 59. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1993; 41(1):107-111.
 60. Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology.* 2001; 90:494-507.
 61. Sung WS, Dong G L. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry.* 2010; 82(1):219-226.

Legenda de Figuras

Figura 1. Influência do extrato de erva-mate sobre **A)** *C. albicans* e **B)** *C. krusei* considerando o perfil de hidrofobicidade em superfície celular (HSC). Teste Anova

Figura 2. Perfil de adesão de *C. albicans* e *C. krusei* sobre superfície de resina acrílica após exposição ao PBS, extrato de erva-mate e clorexidina. Teste Anova

Figura 3. Imagens de MEV de *C. albicans*. **A)** e **D)** Crescimento normal de leveduras. **B)** **E)** **C)** e **F)** Leveduras após o contato com os extratos M2 e M7. Observa-se uma aparente diminuição no crescimento das leveduras, e a maior aumento (12000x) uma visível alteração no formato das leveduras

Figura 4. Imagens de MEV. Leveduras de *C. krusei*, **A)** e **D)** Crescimento normal de leveduras. **B)** **E)** **C)** e **F)** Leveduras após o contato com os extratos M2 e M7. Observa-se uma diminuição aparente no crescimento das leveduras, e a maior aumento (12000x) uma visível alteração no formato das leveduras

Figura 5. Perfil de aderência de *C. albicans* sobre CEB.

Figura 6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Figura 7. Curva de calibração e equação da reta dos compostos cafeína e ácido clorogênico

Legenda de Tabelas

Tabela 1. Extratos de erva-mate preparados com diferentes líquidos extratores a partir dos indivíduos 1 e 2.

Tabela 2. Teste de susceptibilidade dos extratos de erva-mate (ILEX) contra *C. albicans* e CNCA, utilizando cinco extratos de cada indivíduo (I1, I2).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Tabela 4. Formação de biofilme (Shin, 2002), antes e após exposição dos extratos de erva-mate, e clorexidina.

Tabela 5. Perfil de aderência de *C. albicans* sobre CEB.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos: cafeína, ácido clorogênico, e as misturas de 4:1 de cafeína, e 1,7:1 de cafeína, simulando as concentrações das frações encontradas nos extratos M7 e M2 respectivamente.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Preparação do extrato bruto de erva mate.



Figura 1. Separação das folhas e talhos



Figura 2. Secagem das folhas



Figura 3. Trituração das folhas



Figura 4. Preparação do extrato



Figura 5. Filtração do extrato de erva mate.



Figura 6. Rotaevaporação do extrato de erva mate.



Figura 7. Liofilização dos extratos



Figura 8. Armazenamento dos extratos em frasquinhos de vidro com identificação



Figura 9 – 10. Preparo dos extratos para os ensaios com água destilada

APÊNDICE B. *Candida* spp. e condições de crescimento

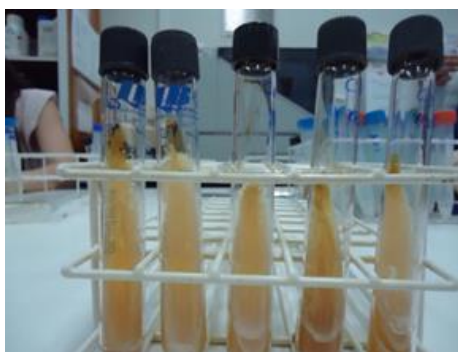


Figura 11. Crescimento das cepas em ágar inclinado de *Candida* sp, após cultivo de 24 h a 37° C na estufa.



Figura 12. Preparo do Inóculo 24 h antes do experimento.

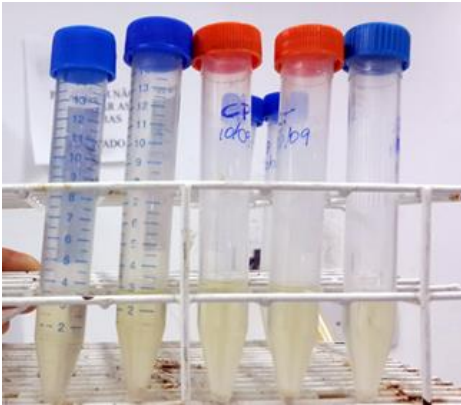


Figura 13. Crescimento das cepas em Caldo Sabouraud a 37 °C.

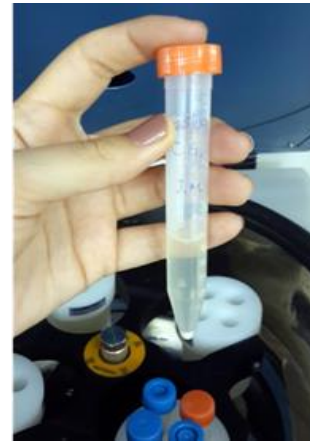


Figura 14. Lavagens dos inóculos com água destilada.

APÊNDICE C. Ensaio de Hidrofobicidade de superfície celular (HSC)

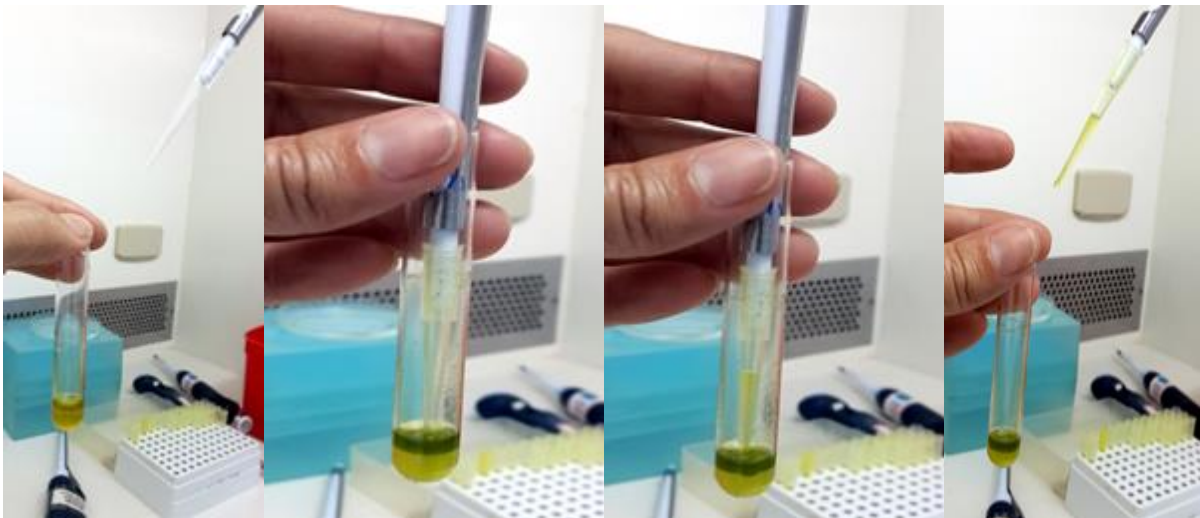


Figura 16. Tubos após adição do *n*-hexadecano, retirada da fase aquosa e pipetada para uma microplaca de 96 poços.

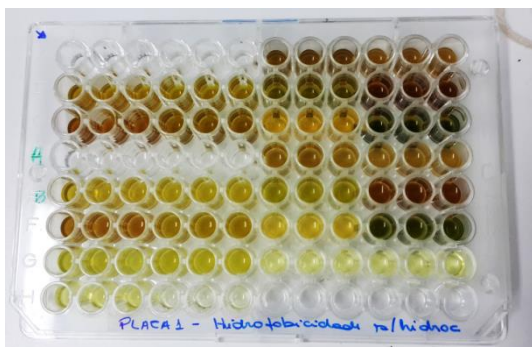


Figura 15. Placa de 96 poços utilizada no ensaio de

APÊNDICE D. Adesão em células epiteliais bucais (CEB)

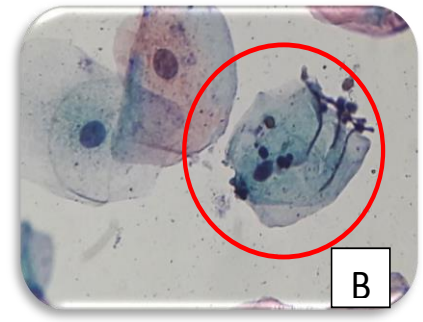
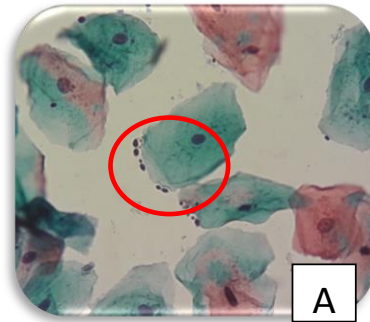


Figura 17. Microscópio óptico de luz invertida usado na contagem de UCF/campo do ensaio de adesão em CEB.

Figura 18. Adesão de *C. albicans* na CEB (Microscópio óptico). A) controle B) Após extrato de erva mate

APÊNDICE E. Adesão em superfícies de resina acrílica

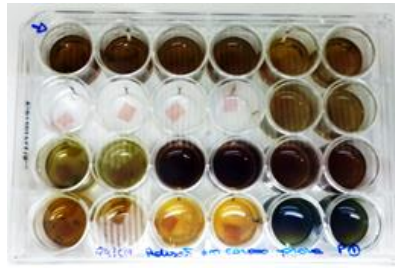


Figura 19. Pipetagem do extrato de erva mate para uma placa de 24 poços com corpos de prova em resina acrílica

Figura 20. Placa de 24 poços com corpos de prova em resina acrílica

Figura 21. Inóculo inserido em gotas em SDA, após 18 h de incubação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e contagem das UFC em três diluições 1:1000, 1:100 e 1:10.

APÊNDICE F. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

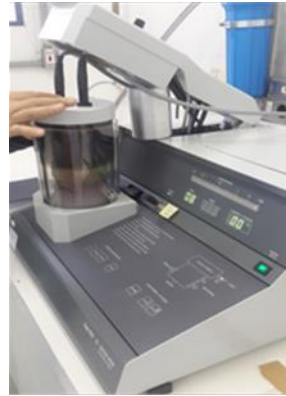
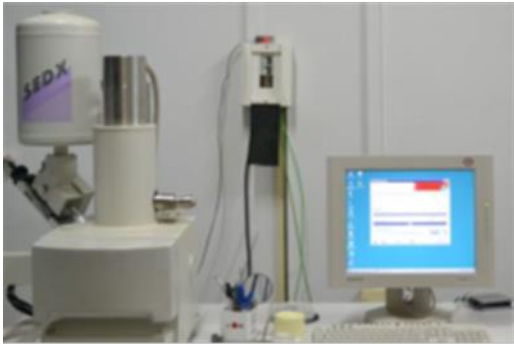


Figura 22. Microscópio electrónico de varredura (MEV). Figura 23. Aparelho de ponto crítico

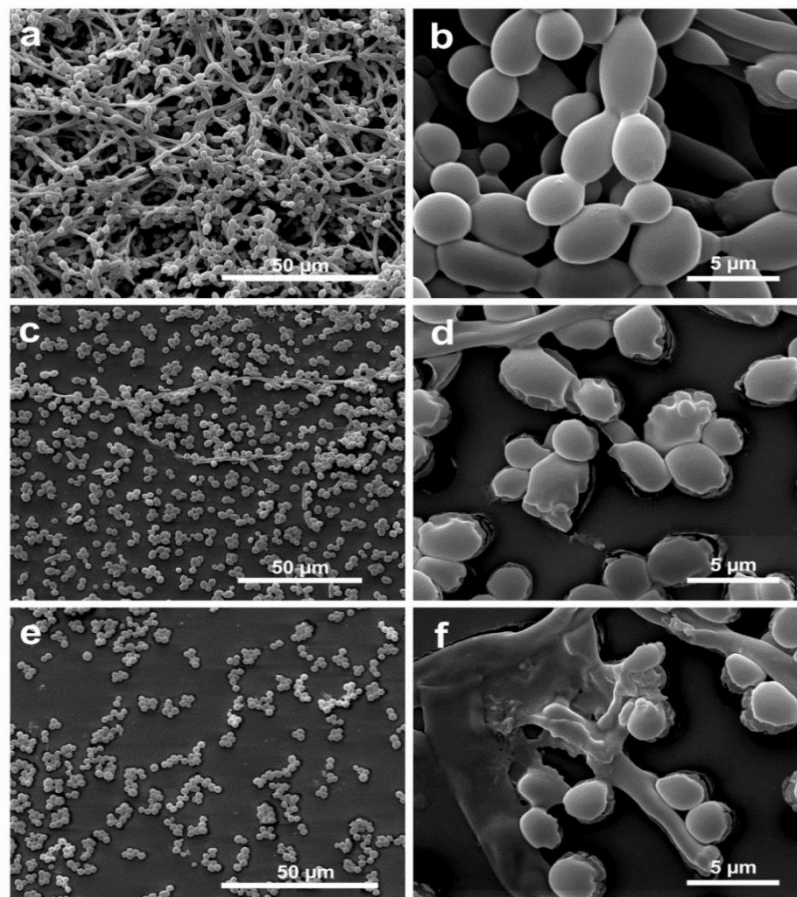


Figura 24. Eletronicografias obtidas em MEV de *C. albicans* tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. a: *C. albicans* não tratada (controle) em 1600 x. b: *C. albicans* não tratada (controle) em 12000 x. c: *C. albicans* tratada com o extrato M2 em 1600 x. d: *C. albicans* tratada com o extrato M2 em 12000 x. e: *C. albicans* tratada com o extrato M7 em 1600 x. f: *C. albicans* tratada com o extrato M7 em 12000 x

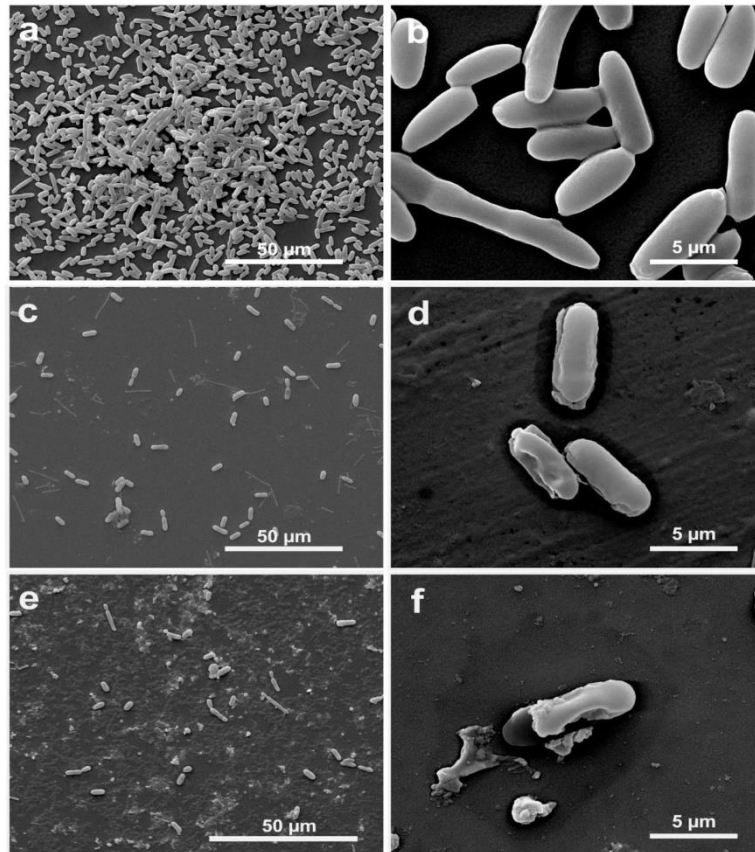


Figura 25 Eletromicrografias obtidas em MEV de *C. krusei* tratadas com diferentes extratos de erva-mate (M2 e M7) na concentração de 625 µg/mL. a: *C. krusei* não tratada (controle) em 1600 x. b: *C. krusei* não tratada (controle) em 12000 x. c: *C. krusei* tratada com o extrato M2 em 1600 x. d: *C. krusei* tratada com o extrato M2 em 12000 x. e: *C. krusei* tratada com o extrato M7 em 1600 x. f: *C. krusei* tratada com o extrato M7 em 12000 x.

APÊNDICE F. Equipamentos utilizados nos ensaios

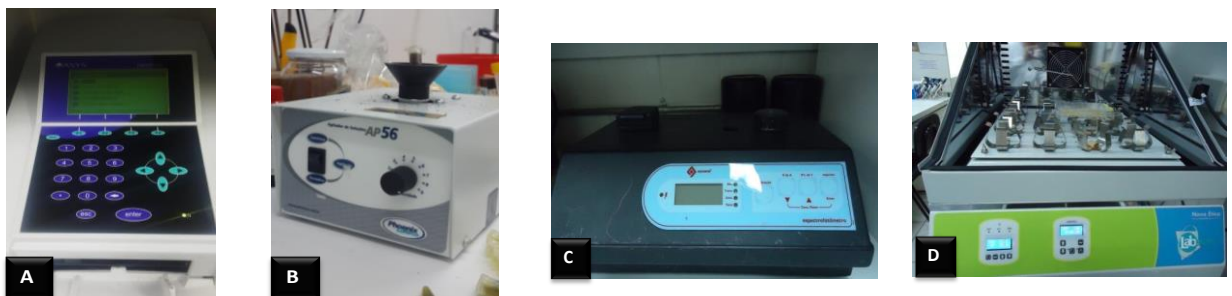


Figura 26. A) Leitora de microplaca (Expert plus – ASYS, UK) B) Agitador de tubos (Vórtex AP56 - Phoenix, Brasil); C) Espectrofotômetro (Baush & Lomb); D) Incubadora (Shaker NT712).

ANEXO

ANEXO A – Normas para publicação

Archives of Oral Biology

Editors-in-Chief:

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

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

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

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

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

Online submission of papers

<http://ees.elsevier.com/aob>

Submission and peer review of all papers is now conducted entirely online. Authors are guided stepwise through the entire process, and can follow the progress of their

paper. The system creates a PDF version of the submitted manuscript for peer review, revision and proofing. All correspondence, including the editors' decision and request for revisions, is conducted by e-mail. Authors requesting further information about online submission should follow the tutorial, at <http://ees.elsevier.com/aob>.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Each manuscript must be accompanied by a statement signed by all authors that the manuscript in its submitted form has been read and approved by them. Authors must supply details of related papers submitted or recently published elsewhere. Submissions lacking this documentation will not be reviewed until it is supplied.

Authors are invited to suggest up to three referees they consider suitable to review their submission. The suggested reviewers should not have collaborated with the authors in the last 5 years. Full postal and email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilize these suggestions.

Authorship All authors should have made substantial and material contributions to the paper. These would include the individuals responsible for the conception and design of the experiments and the interpretation of data. If the work was conducted using non-institutional grant funds the Principal Investigator on the funded grant should be included in the authorship. Individuals who gave purely technical help or advise, for example, on statistical tests or provided materials such as cell lines and antibodies should be included in the Acknowledgements. 'Guest' authors are unacceptable. The Acknowledgements should also include the source of the funds used and the Principal Investigator to whom they were awarded. If the manuscript has four or more authors listed, a letter describing the contribution of each should be included. Submissions lacking this documentation will not be reviewed until they are supplied.

Conflict of interest

The potential for conflict of interest exists when an author (or the author's institution), has financial or personal relationships that may influence his or her actions. Authors are specifically asked to reflect on financial conflicts of interest (such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria and paid expert testimony) as well as other forms of conflict of interest, including personal, academic and intellectual issues. At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships that could influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest a statement confirming such should be included

Ethics

Studies on human beings.

Such studies submitted to Archives of Oral Biology should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. The declaration was adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989 (www.wma.net/e/policy/b3.htm). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. A copy of the institutional approval should be included. Submissions lacking these documents will not be reviewed until they are supplied. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Studies on animals.

The experimental procedures and care of animals should be in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (<http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>). The authors must state that animal care was in accordance with both these and institution guidelines. Signed documents of approval by institutional committees should be included as well as a statement from the authors that the study met the standards described in the European Convention. Submissions lacking these documents will not be reviewed until they are supplied.

Copyright

Accepted papers become the copyright of the Journal and are accepted on the understanding that they have not been published, are not being considered for publication elsewhere and are subject to editorial revision. If papers closely related to the submitted manuscript have been published or submitted for publication elsewhere, the author must state this in their cover letter. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

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: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Scientific Standards

The aim of Editors and referees is to maintain a high standard of scientific communication. Normally papers are assessed by two referees selected by the Editor, and decisions regarding acceptance are based mainly upon the advice of the referees. Where appropriate, the referees' views are forwarded to the authors for their consideration. Authors may occasionally consider referees' suggestions to be ill-conceived but if their text is misunderstood by referees it is likely to be misunderstood by readers of the journal.

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Manuscript Preparation

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal, English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be British or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods, Results or Findings, Discussion.

Authors will gain much assistance by consulting: Council of Biology Editors Style Manual Committee. *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 6th edition. New York: Cambridge University Press, 1994.

We suggest that authors consider using a language editing service to improve the English language usage and quality of a paper. A number of language editing companies will provide their services to our authors at competitive rates. Please follow [this link](http://elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languageediting/) for further details <http://elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languageediting/>. The editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the Journal's standards of clarity and conciseness.

General

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 10 or 12 points. The corresponding author should be identified (include a fax number and email address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as

most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

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.

Title page

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

Structured abstract

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

Received/accepted dates

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor. An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

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.

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 $P<0.0005$.

Discussion

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

References All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to Index Medicus, or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. Arch Oral Biol 2004;49(2):149-154. For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Units and symbols

In general, *Archives of Oral Biology* will use the recommended SI (Système Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm³ and ml³ in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology

Abbreviations

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

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'. 92

Numbers, measurements and statistics.

Numbers one to nine are spelled out unless they are measurements (e.g. 5 ml). Numbers greater than nine are spelled out if they begin a sentence, or when clarity

requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than ml.h⁻¹ or ml per h.

Drugs

These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparation, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, London, UK).

Illustrations

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching). The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on www.elsevier.com/artworkinstructions. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

General: Information relating to the preferred formats for artwork and illustrations may be found at www.elsevier.com/authors. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate page.

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome. Please note that figures supplied in colour will appear online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Begin each table on a separate page. Footnotes to tables should be typed below the table and referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

Revised manuscripts

Frequently authors are required to submit revised versions of manuscripts in the light of reports from expert reviewers and editorial comments. Revised manuscripts must clearly show revisions and authors must clearly indicate the positions of revisions in a covering letter that addresses the concerns of reviewers/ editors.

Proofs One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author which they are requested to correct and return within **48 hours**. Only minor corrections are acceptable at this stage. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post. Elsevier now sends PDF proofs that can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting the line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

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. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles please visit www.elsevier.com/authors. This website provides information on article submission as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Further questions may be directed to the journal editorial office: *Archives of Oral Biology*, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK. Email: aob@elsevier.com