

**Potencial antifúngico do extrato de *Terminalia catappa* Linn. sobre  
biofilme de *Candida albicans* desenvolvido em resina acrílica**

Fabio Santos Costa

São Luís

2018

Fabio Santos Costa

**Potencial antifúngico do extrato de *Terminalia catappa* Linn. sobre  
biofilme de *Candida albicans* desenvolvido em resina acrílica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Odontologia Integrada.

Orientador: Profa. Dra. Leticia M. Goncalves

Co-Orientador: Profa. Dra Elizabeth Fernandes

São Luís

2018

Nome: Fabio Santos Costa

Título: Potencial antifúngico do extrato de *Terminalia catappa* Linn.  
sobre biofilme de *Candida albicans* desenvolvido em resina acrílica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de  
Mestre.

Aprovado em : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha esposa Adriana e aos meus filhos amados Alice e Pedro, que são hoje os principais alicerces da minha vida.

À minha mãe, Roselene Costa e, em especial ao meu pai, Eptácio Costa, que sempre me mostrou os caminhos da vida e principalmente por me oferecer inúmeras oportunidades e apoio em toda minha formação, sem um minuto sequer, deixar de acreditar em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente a minha orientadora, profa. Dra. Leticia Machado Gonçalves, pelo apoio em todas as fases desta pesquisa e, principalmente pela oportunidade em poder pesquisar um tema tão importante.

Agradeço aos meus Co-Orientadores, profa. Dra. Elisabeth Soares Fernandes e ao Prof. Dr. Eduardo Buozi Moffa por toda ajuda prestada.

A todas as colegas de turma, pela amizade e companhanherismo e , pela grande ajuda prestada durante todo esse processo do mestrado.

À sra Erymonica pela , presteza, paciência e disposição em sempre nos ajudar.

*“Qualquer sucesso que custe a sua família é  
um tremendo fracasso”*

*Pr. Joaquin Neto*

COSTA F.S. Potencial antifúngico do extrato de *Terminalia catappa* Linn. sobre biofilme de *Candida albicans* desenvolvido em resina acrílica. São Luís, Universidade Ceuma, 2018.

## RESUMO

Este estudo investigou se a imersão de discos de resina acrílica para prótese dental em extrato hidro-alcóolico de *Terminalia catappa* Linn. (TCE) foi eficiente na redução de biofilmes de *Candida albicans*. Inicialmente, foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do TCE em suspensões planctônicas de *C. albicans*. Para a análise do biofilme, discos de resina acrílica padronizados (10 x 2 mm) foram fabricados e tiveram sua rugosidade de superfície padronizada. Biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos sobre os discos durante 24 horas e, em seguida, imersos nos seguintes tratamentos durante 8 horas: solução salina tamponada com fosfato (PBS, controle), TCE nas concentrações CIM, 5xCIM e 10xCIM. O biofilme foi investigado quanto a viabilidade através da contagem de células (células/mL) e microscopia de fluorescência. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. A concentração mínima de TCE necessária para inibir o crescimento de *C. albicans* foi de 6,25 mg/mL, enquanto o CFM observado foi de 12,5 mg/mL. A imersão do biofilme na CIM se mostrou suficiente para reduzir 80% das

células viáveis em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ). As imagens obtidas na microscopia confirmaram que a imersão em 5xCIM e 10xCIM apresentaram uma atividade tipicamente fungicida, não havendo diferenças significativas entre estas concentrações em relação a contagem de células viáveis ( $p > 0,05$ ). Considerando as limitações deste estudo, foi possível concluir que a imersão em TCE foi eficiente na redução de biofilme de *C. albicans* desenvolvidos em disco de resina acrílica para prótese dental.

**Palavras-chave:** *Terminalia catappa* Linn, biofilme, *Candida albicans*.



COSTA FS. Antifungal potential of *Terminalia catappa* Linn. extract in *Candida albicans* biofilms developed on acrylic surface. São Luis, Ceuma University, 2018.

## ABSTRACT

This study investigates whether immersion of denture acrylic discs in *Terminalia catappa* Linn. extract (TCE) has effects on *Candida albicans* biofilms developed on denture acrylic surface. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) assays were performed for TCE against planktonic suspensions of *C. albicans*. For biofilm analysis, discs (10 x 2mm) were fabricated using a denture acrylic resin with surface roughness standardized. *C. albicans* biofilms were developed for 24 hours and, then, were immersed in the following treatments overnight (8 hours): phosphate-buffered saline (PBS, control), TCE at MIC, 5xMIC or 10xMIC. Biofilms were investigated for cell counting and microscopic analysis. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey test at 5% significance level. The minimal concentration of TCE required to inhibit *C. albicans* growth was 6,25 mg/mL, while MFC was 12,5 mg/mL. Immersion in TCE at MIC was sufficient to reduce 80% of biofilm viable cells compared to control group ( $p < 0.001$ ). Microscopy images confirm that immersion at 5xMIC and 10xMIC had a fungicidal activity, with no significant differences between these concentrations regarding viable cells counts ( $p > 0.05$ ).

Within the limitations of this study, it could be concluded that immersion in TCE was effective in reducing *C. albicans* biofilm developed on denture acrylic surfaces.

**Keywords:** *Terminalia catappa* Linn. biofilm, *Candida albicans*.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	12
Potencial antifúngico do extrato de <i>Terminalia catappa</i> Linn. sobre biofilmes de <i>Candida albicans</i> desenvolvidos em discos de resina acrílica para prótese dental .....	13
Resumo .....	14
Introdução .....	15
Materiais e Métodos .....	18
Resultados .....	23
Discussão .....	27
Conclusão .....	29
Referências .....	30
<b>ANEXO</b>	
Metodologia detalhada .....	35
Normas da revista.....	45

# ***CAPITULO 1***

**Potencial antifúngico do extrato de *Terminalia catappa* Linn. sobre  
biofilme de *Candida albicans* desenvolvido em resina acrílica**

Fábio Santos Costa<sup>a</sup>, Letícia Machado Gonçalves<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Ceuma,  
São Luís, Maranhão, Brasil

<sup>a2</sup> Departamento de Odontologia, Universidade Ceuma, São Luís, Brasil

Artigo formatado de acordo com as normas da revista: **Clinical  
Cosmetic and investigational dentistry.**

Autor para correspondência:

Prof. Letícia Machado Gonçalves

Uniceuma

PPG Odontologia

Rua Josué Montello, no 1, Renascença II

São Luís, MA, Brasil

65075-120

[lets.mg@gmail.com](mailto:lets.mg@gmail.com)

\* Autor correspondente:

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Ceuma, Rua  
Josué Montello, número 1, Bairro Jardim Renascença II, São Luís,  
Maranhão, Brasil, 65075-120. Phone: +55 98 3214-4127.

E-mail: [lets.mg@gmail.com](mailto:lets.mg@gmail.com)

## Resumo

Este estudo investigou se a imersão de discos de resina acrílica para prótese dental em extrato hidro-alcóolico de *Terminalia catappa* Linn. (TCE) foi eficiente na redução de biofilmes de *Candida albicans*. Inicialmente, foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do TCE em suspensões planctônicas de *C. albicans*. Para a análise do biofilme, discos de resina acrílica padronizados (10 x 2 mm) foram fabricados e tiveram sua rugosidade de superfície padronizada. Biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos sobre os discos durante 24 horas e, em seguida, imersos nos seguintes tratamentos durante 8 horas: solução salina tamponada com fosfato (PBS, controle), TCE nas concentrações CIM, 5xCIM e 10xCIM. O biofilme foi investigado quanto a viabilidade através da contagem de células (células/mL) e microscopia de fluorescência. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. A concentração mínima de TCE necessária para inibir o crescimento de *C. albicans* foi de 6,25 mg/mL, enquanto o CFM observado foi de 12,5 mg/mL. A imersão do biofilme na CIM se mostrou suficiente para reduzir 80% das células viáveis em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ). As imagens obtidas na microscopia confirmaram que a imersão em 5xCIM e 10xCIM apresentaram uma atividade tipicamente fungicida, não havendo diferenças significativas entre estas concentrações em relação a contagem de células viáveis ( $p > 0,05$ ). Considerando as

limitações deste estudo, foi possível concluir que a imersão em TCE foi eficiente na redução de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos em disco de resina acrílica para prótese dental.

**Palavras-chave:** *Terminalia catappa* Linn, biofilme, *Candida albicans*

## **Introdução**

A *Candida albicans* é o principal microrganismo envolvido na etiologia da Candidose associada ao uso de próteses (CAP). Este fungo é naturalmente encontrado na cavidade oral, podendo formar comunidades complexas denominadas de biofilmes, os quais podem aderir à superfície dos dentes, mucosa circundante e superfícies acrílicas, como as próteses dentais [1,2].

A transição deste patógeno de uma condição normal de comensalismo para uma situação de parasitismo pode ocorrer durante um desequilíbrio entre o hospedeiro e o fungo [3]. Este desequilíbrio torna o fungo capaz de romper as barreiras de proteção da mucosa oral e na maioria das vezes está relacionado a fatores locais e/ou sistêmicos do hospedeiro. Dentre estes fatores pode-se citar o uso de próteses, traumatismos na mucosa, higiene bucal deficiente, dieta rica em carboidratos, hipossalivação (podendo ser associada ao uso de medicamentos), além de desordens endócrinas e imunológicas [4]. Embora esta patologia possa manifestar-se assintomática, alguns pacientes podem sofrer desconforto como inchaço, dor e sensações de

queimação na boca, prejudicando a ingestão de líquidos e alimentos e, conseqüentemente, a qualidade de vida destes pacientes [2-4].

Na tentativa de restabelecer a saúde bucal através do controle da formação do biofilme, a remoção mecânica através da escovação apresenta-se como o método mais utilizado, sendo de fácil acesso e baixo custo. No entanto, a resina acrílica apresenta poros em sua superfície e, em algumas situações, as cerdas da escova não conseguem acessar e limpar adequadamente estes poros. Somado a isto, sabe-se que muitos usuários de próteses são pacientes idosos, os quais podem apresentar acuidade visual diminuída ou mesmo perda da habilidade motora, comprometendo a escovação adequada [5].

O uso de soluções químicas para a imersão da prótese também é recomendado como método complementar à limpeza mecânica [5]. O hipoclorito de sódio é amplamente empregado, sendo capaz de realizar uma limpeza eficiente, porém apresenta desvantagens tais como sabor e odor desagradáveis, além de alteração da resistência e cor da resina acrílica quando usada em regime prolongado [6]. Os limpadores químicos são substâncias disponíveis comercialmente cuja ação de limpeza ocorre pelo efeito exercido pela efervescência produzida quando o produto é dissolvido na água, no entanto, observa-se que este método é falho na remoção de biofilmes de *C. albicans* [5,6].

A prescrição de agentes antifúngicos como fluconazol e nistatina podem ser utilizados nos casos em que a CAP é considerada uma infecção recorrente e/ou resistente. Porém, o uso indiscriminado destes



fármacos foi um fator preponderante para a seleção de cepas resistentes, o que, muitas vezes, pode levar ao insucesso do tratamento de candidíase [7]. Percebe-se que as limitações oferecidas pelo controle químico/mecânico dos biofilmes, bem como a resistência antifúngica, têm implicações importantes no insucesso do tratamento da CAP. Dessa forma, a busca por substâncias antifúngicas a partir de fontes naturais se tornou uma tendência na literatura médico-odontológica [7-9-11].

Entre os produtos naturais, cita-se a *Terminalia catappa* Linn ou “amendoeira da praia”, planta destacada por ter uma composição química diversificada [12-19]. Os extratos de folhas de *T. catappa* L. exibem atividades biológicas variadas como antioxidante [6,12], antiviral [14], anti-inflamatória [15] e antimicrobiana [16]. Estudos sugerem sua eficácia contra bactérias [17] e fungos [18], mas pouco se sabe sobre os efeitos de *T. catappa* L. em biofilmes de *C. albicans* [18].

Dada a escassez de informações a respeito da ação de *T. catappa* em cepas de *C. albicans* e considerando a importância da descoberta de novos agentes para o manejo de patologias biofilme-dependentes, este estudo teve como objetivo avaliar se a imersão de discos de resina acrílica em extrato hidro-alcóolico de *Terminalia catappa* Linn. (TCE) foi eficiente na redução de biofilmes de *C. albicans*.

## **Materiais e Métodos**

### *Delineamento experimental*

O potencial antifúngico do TCE em células planctônicas de *C. albicans* foi verificado através dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Para a análise do biofilme, discos de resina acrílica para prótese dental (10 x 2 mm) foram fabricados e tiveram sua rugosidade de superfície padronizada. Biofilmes de *C. albicans* foram desenvolvidos sobre os discos durante 24 horas e, em seguida, imersos nos seguintes tratamentos durante 8 horas: solução salina tamponada com fosfato (PBS, controle), TCE nas concentrações CIM, 5xCIM e 10xCIM. Os biofilmes foram investigados quanto a viabilidade celular e microscopia de fluorescência. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

### *Coleta, identificação botânica e preparação de extrato*

As folhas de *T. catappa* L. foram colhidas no campo experimental da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil. A amostra foi coletada de Janeiro de 2016 a setembro de 2016. A exsicata foi preparada e enviada ao Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão para identificação botânica. As folhas foram secas separadamente em uma estufa com circulação de ar de 37°C durante 48 horas, seguidas de trituração em um moinho. O material seco e triturado (aproximadamente 200g) foi

macerado com etanol 70% durante 24 horas, à temperatura ambiente. Este processo foi repetido quatro vezes, e o extrato obtido foi filtrado e depois concentrado utilizando rotaevaporador rotativo a vácuo (MA 120/TH). O resíduo seco foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) até uma concentração final de 100 mg/mL, filtrado em membrana de 0,22 µg/mL e mantidos em frascos âmbar esterilizados a 4°C.

#### *Reativação de C. albicans*

*C. albicans* (ATCC 90028) foi cultivada aerobiamente em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Difco, Detroit, MI, EUA) durante 24 horas a 37°C. Uma amostra destas células foram inoculadas em meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB; Difco, Detroit, MI, EUA), suplementado com glicose 100 mM, e incubadas a 37°C. Durante a fase de crescimento exponencial (isto é, após 18-20 horas de incubação), as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salina (PBS). O inóculo foi preparado a partir destas células em YNB suplementado com glicose 50 mM, e padronizado utilizando espectrofotômetro até atingir uma quantidade de  $\sim 10^7$  células/mL (OD = 0,25 a 520 nm).

#### *Testes de suscetibilidade*

Os testes CIM e CFM foram determinados usando os padrões M27-A3 [20]. Para todos os testes, o fluconazol (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como controle positivo. O PBS foi

utilizado como controle negativo e o DMSO também foi utilizado para controle do solvente. A CIM foi definida como a menor concentração de TCE que foi capaz de inibir o crescimento das células visíveis a olho nú. As concentrações em que o crescimento não foi visível no teste de CIM foram subcultivadas em placas de SDA e incubados a 37°C durante 48 horas. CFM foi considerada a menor concentração de TCE capaz de eliminar as células fúngicas ( $\geq 99\%$  de morte).

#### *Fabricação de discos*

Discos (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram fabricados utilizando uma resina acrílica para prótese dental de polimetilmetacrilato (PMMA) (VipiCril Plus, Vipicril, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os discos foram preparados usando uma matriz inoxidável nas dimensões padronizadas. Para simular o lado interno de uma prótese dental, as superfícies do disco foram acabadas e polidas em politriz horizontal (modelo APL-4, Arotec, São Paulo, Brasil) usando lixas de óxido de alumínio (320, 400 e 600). A rugosidade superficial de todos os discos foi analisada por um rugosímetro (Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão). Para cada superfície foram realizadas três medidas, a média para cada disco foi calculada e a rugosidade da superfície interna foi padronizada a  $0,31 \pm 0,05 \mu\text{m}$ . Após, os discos foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 1,0% durante 3 minutos para remover contaminantes.

### *Desenvolvimento de biofilmes*

Sob condições assépticas, cada disco foi inserido em uma placa de cultura de 24 poços e uma alíquota de inóculo de *C. albicans* previamente ajustado ( $\sim 10^7$  células/mL) foi adicionada a cada poço. A placa de cultura foi incubada aerobiamente a 37°C durante 24 horas para desenvolvimento dos biofilmes. Os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS para remover células não aderentes e imersos 8 horas a 37°C nos seguintes tratamentos: PBS (controle), TCE em CIM, 5xCIM ou 10xCIM. A análise dos biofilmes foi realizada através da contagem de células e microscopia de fluorescência.

### *Contagem de Células*

Para a contagem de células, os discos foram lavados duas vezes com PBS e sonicados (7 W, por 30s) para permitir a desagregação da estrutura do biofilme. As soluções obtidas foram submetidas a diluição decimal seriada e semeadas em placas de SDA. As placas foram incubadas aerobiamente durante 24 horas a 37°C. Após, as células foram contadas com o suporte de um estereomicroscópio e transformadas em ufc/mL.

### *Análise microscópica*

A estrutura do biofilme foi avaliada com microscopia de fluorescência (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os discos foram lavados duas vezes com PBS, corados por SYTO-9 e

iodeto de propídio com o kit de viabilidade Live/Dead BacLight (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), com um tempo de incubação de 20 minutos a 37°C e protegido da luz. Pelo menos cinco campos ópticos escolhidos aleatoriamente foram examinados para cada disco usando a lente de imersão de 63,4x.

#### *Análise estatística*

Os dados foram analisados estatisticamente pelo software SAS/LAB (SAS Software, versão 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os dados de contagem de células foram analisados por ANOVA seguido do teste HSD de Tukey, no qual o tratamento de imersão foi considerado o fator de estudo. O nível de significância foi estabelecido em 5% para todos os testes.

## Resultados

### *Testes de suscetibilidade*

A análise revelou que a quantidade de TCE necessária para inibir o crescimento de células planctônicas de *C. albicans* foi de 6,25 mg/mL, enquanto que a concentração necessária para efeitos fungicida foi de 12,5 mg/mL (isto é, CIM e CFM, respectivamente) . O valor de CIM para fluconazol utilizado como grupo controle variou de 1,0 a 0,5 µg/mL. A relação CFM:CIM demonstrou que o TCE é considerado fungicida contra *C. albicans*, uma vez que os extratos são fungicidas quando a relação CFM:CIM é entre 1:1 a 2:1, conforme proposto anteriormente [21,22].

### *Potencial antifúngico em biofilmes*

A Figura 1 representa a contagem de células do biofilme de *C. albicans* após imersão em TCE em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a imersão por 8 horas em TCE teve um efeito significativo na redução de células em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), independentemente da concentração utilizada. A imersão na CIM foi suficiente para reduzir 80% das células viáveis do biofilme quando comparado ao grupo controle em PBS ( $p < 0,001$ ).

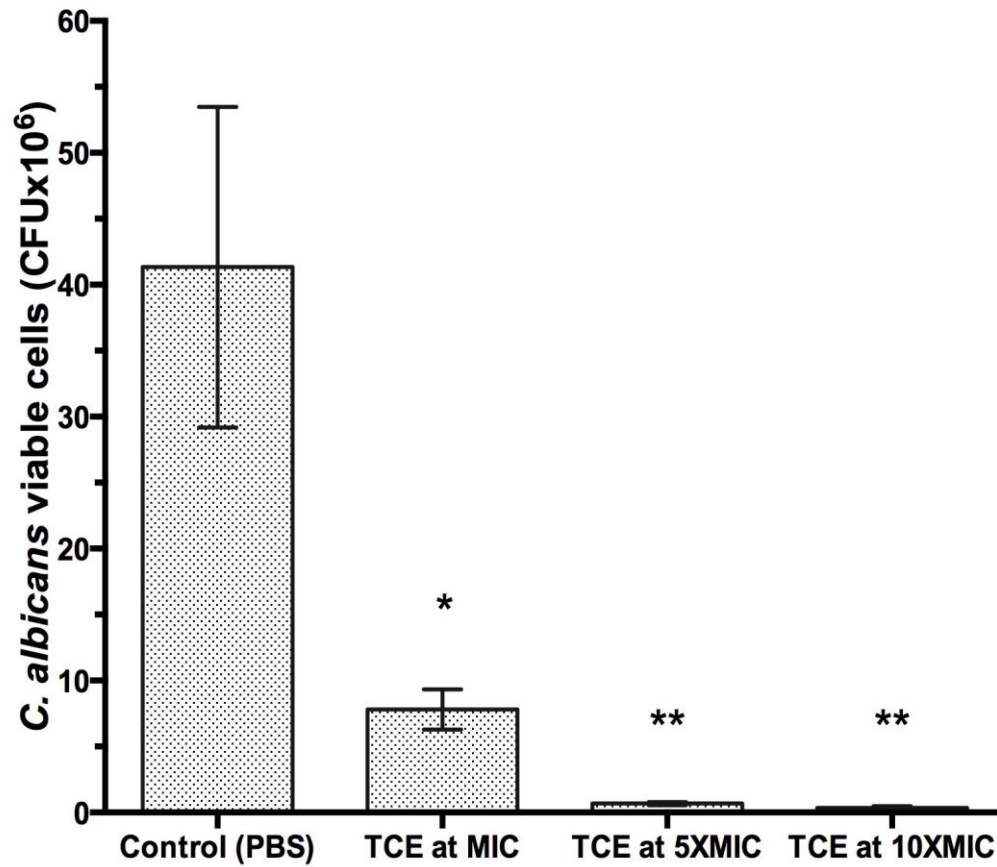


Figure 01. Contagem de células do biofilme de *C. albicans* desenvolvidos em discos de resina acrílica para prótese dental após imersão por 8 horas em PBS, TCE em CIM, 5xCIM ou 10xCIM. Símbolos diferentes (\*,\*\*) representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA seguido do teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).



### *Análise microscópica*

A microscopia revelou que TCE nas diferentes concentrações alterou a viabilidade das células fúngicas comparado ao grupo controle com PBS (Figura 02). As imagens confirmam que a imersão em 5xCIM e 10xCIM apresentaram um comportamento fungicida, como observado na análise de contagem de células.

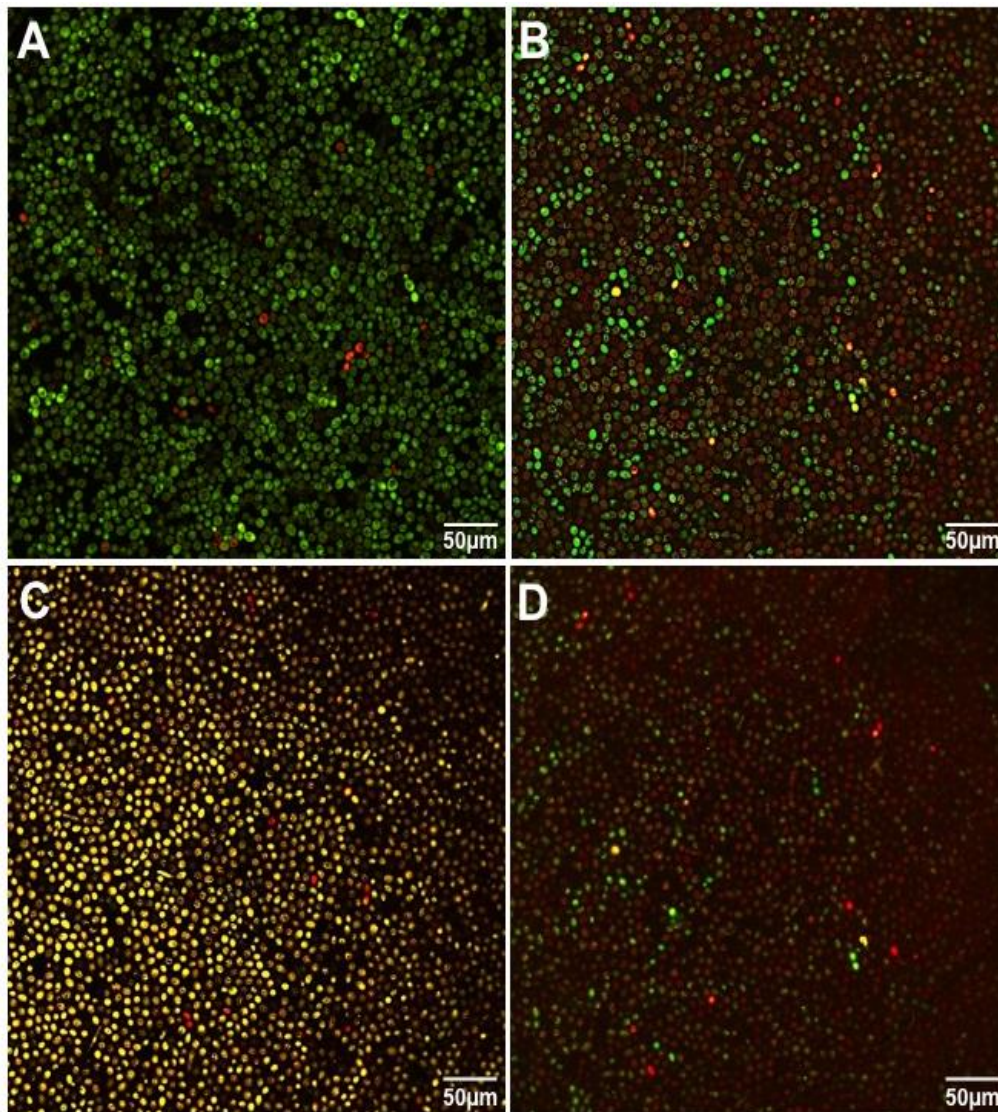


Figura 02. Fotomicrografia representativas do biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos em discos de resina acrílica após imersão por 8 horas em PBS (A), TCE em CIM (B), 5xCIM (C) ou 10xCIM (D). SYTO-9 e iodeto de propídio coraram as células vivas em verde e mortas em amarelo/vermelho, respectivamente.

## Discussão

*T. catappa L.* é uma espécie de planta que contém uma grande variedade de componentes químicos [12-19] e é amplamente utilizada na medicina tradicional na Índia, Malásia e Indonésia. No entanto, estudos sobre as propriedades antifúngicas desta planta são escassos e pouco se sabe sobre as atividades anti-*Candida* de extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de folhas de *T. catappa L.* (TCE). Neste estudo, foram apresentadas evidências importantes sobre o potencial antifúngico do TCE quando usado como uma solução de imersão para reduzir o biofilme de *C. albicans* desenvolvidos em resina acrílica.

Os testes de suscetibilidade demonstram que o TCE tem comportamento fungistático a 6,25 mg/mL em células planctônicas de *C. Albicans*, e fungicida a 12,5 mg/mL. Em relação aos resultados de CIM, foi proposta uma classificação para a atividade antimicrobiana de produtos vegetais da seguinte maneira: inibidores fortes, CIM até 0,5 mg/mL; inibidores moderados, CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL; e inibidores fracos, CIM acima de 1,6 mg/mL [23]. Considerando esta classificação, o extrato de TCE foi considerado um inibidor fraco independentemente dos bons resultados obtidos. Porém não podemos afirmar isso com exatidão, uma vez que, o outro estudo citado aborda formas planctônicas e bactérias que são formas mais fáceis de serem debeladas do que o biofilme abordado em nossa pesquisa.

Os efeitos antifúngicos do TCE em células planctônicas já foram estabelecidos anteriormente [18], e os dados apresentados estão de

acordo com a literatura. No entanto, considerando que a maioria das células de *Candida* na cavidade bucal estão associadas a biofilmes e que os biofilmes diferem substancialmente das células planctônicas em termos de maior resistência antifúngica [6-8], investigar o comportamento de células organizadas como biofilmes quando expostas a TCE é essencial.

A imersão do biofilme desenvolvido no disco de resina foi realizada por 8 horas a fim de simular o período de imersão da prótese durante a noite, por aproximadamente 8 horas [9]. Nestas condições, os resultados demonstraram que a imersão em TCE na CIM foi suficiente para reduzir o número de células viáveis quando comparado ao grupo controle.

A análise e caracterização química do TCE pode explicar os resultados alcançados. Recentemente, um estudo detectou a presença de taninos hidrolisáveis (punicalina e punicalagina), ácido gálico e fenóis glicosilados (especialmente os glicosídeos C-flavonóides) na análise química de *T. catappa L.* [18]. Além disso, sabe-se que taninos hidrolizáveis são os principais constituintes químicos de folhas de *T. catappa L.* e que estão associados às atividades antioxidantes atribuídas a esta planta [16,24]. O mesmo grupo de compostos foi associado a uma forte atividade antimicrobiana em relação a bactérias e fungos [25-27].

Além disso, o ácido gálico e os fenóis glicosilados podem contribuir para a sua atividade antifúngica [18]. Pesquisas anteriores

mostram que o ácido gálico obtido a partir do extrato encontrado em outras plantas tem um potencial antimicrobiano [28]. Além disso, os compostos fenólicos glicosilados têm apresentado propriedades antifúngicas de interesse. Especificamente, os ácidos fenólicos demonstraram atividade promissora in vitro e in vivo contra espécies de *Candida* [29,30]. A grande quantidade de células mortas coradas em amarelo/vermelho observadas nas imagens microscópicas pode confirmar os potenciais efeitos fungicidas do TCE, provavelmente devido aos seus compostos ativos. Investigações futuras devem considerar os mecanismos moleculares exatos que explicam a morte das células de *C. albicans*.

A análise química da subfração dez do n-Butanol (SF10-FBuOH) da TCE, detectou a presença de taninos hidrolisáveis (punicalina e punicaligina), ácido gálico e glicosídeos flavonoides. Os taninos hidrolisáveis são associados com forte atividade antimicrobiana contra bactérias e leveduras [18]. Este efeito foi sugerido por envolver a precipitação de proteínas ou a remoção de metal e íons de hidrogênio a partir de enzimas microbianas, modificando processos metabólicos vitais nestes microrganismos [26].

Além dos bons resultados observados de TCE quando utilizados como uma solução de imersão em biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos em resina acrílica para prótese dental, é importante citar que a investigação sobre a citotoxicidade do TCE quando em contato com mucosa oral e os possíveis efeitos sobre as propriedades da

resina acrílica [9], torna-se de extrema importância ao considerar o TCE como um possível tratamento auxiliar para CAP.

### **Conclusão**

Considerando as limitações deste estudo, foi possível concluir que a imersão em TCE foi eficiente na redução de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos em disco de resina acrílica para prótese dental.

## Referências

1. Moosazadeh M, Akbari M, Tabrizi R, Ghorbani A, Golkari A, Banakar M, Sekhavati E, Kavari SH, Bagheri Lankarani L. Denture Stomatitis and *Candida Albicans* in Iranian Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent (Shiraz)*. 2016;17(3 Suppl):283-92.
2. Freires IA, Bueno-Silva B, Galvão LCC, Duarte MCT, Sartoratto A, Figueira GM, Alencar SM, Rosalen PL. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. *Evid-Based Comp and Alter Med*. 2015;871316:9.
3. Di Stasio D, Lauritano D, Minervini G, Paparella RS, Petruzzi M, Romano A, Candotto V, Lucchese A. Management of denture stomatitis: a narrative review. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018;32(2 Suppl. 1):113-6.
4. Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, de Vasconcellos AA, Cury JA, da Silva WJ. Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6:179-85.
5. Duyck J, Vandamme K, Krausch-Hofmann S, Boon L, De Keersmaecker K, Jalon E, Teughels W. Impact of Denture Cleaning Method and Overnight Storage Condition on Denture Biofilm Mass and Composition: A Cross-Over Randomized Clinical Trial. *PLoS One*. 2016; 5;11(1):e0145837.

6. Emami E, Kabawat M, Rompre PH, Feine JS. Linking evidence to treatment for denture stomatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J of Dentistry*. 2014;42:99-106.
7. Terças AL, Marques SG, Moffa EB, Alves MB, de Azevedo CM, Siqueira WL, Monteiro CA. Antifungal Drug Susceptibility of *Candida* Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. *Front Microbiol*. 2017;2;8:298.
8. Nett JE. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12,375-82.
9. Madeira PLB, Carvalho LT, Paschoal MAB, de Sousa EM, Moffa EB, Tavares RJR, Gonçalves LM. *In vitro* Effects of Lemongrass Extract on *Candida albicans* Biofilms, Human Cells Viability, and Denture Surface. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:71.
10. Vieira DR, Amaral FM, Maciel MC, Nascimento FR, Liberio SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J Ethnopharmacol*. 2014;155:1441-9.
11. Galvão LCC, Furletti VF, Bersan SMF, Cunha MG, Ruiz ALTG, Sartoratto A, Figueira GM, Alencar SM, Rosalen PL. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evid-Based Comp and Alter Med*. 2012; 751435:12.



12. Anand AV, Divya N, Kotti PP. An updated review of *Terminalia catappa*. *Pharmacogn Rev.* 2015; 9(18):93-8.
13. Yeh CB, Yu YL, Lin CW, Chiou HL, Hsieh MJ, Yang SF. *Terminalia catappa* attenuates urokinase-type plasminogen activator expression through Erk pathways in Hepatocellular carcinoma. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:141.
14. Amalraj A, Gopi S. Medicinal properties of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn.: A review. *J Tradit Complement Med.* 2016; 20;7(1):65-78.
15. Coulibaly K, Zirihi GN, Guessennnd-Kouadio N, Oussou KR, Dosso M. Antibacterial properties studies of trunk barks of *Terminalia ivorensis* (Combretaceae), a commercial and medicinal specie, on some methicillin-resistant *Staphylococci* spp strains. *Afr Health Sci.* 2014;14(3):753-6.
16. Kinoshita S, Inoue Y, Nakama S, Ichiba T, Aniya Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. *Phytomedicine.* 2007;14:755-62.
17. Jagessar RC, Alleyne R. Antimicrobial potency of the aqueous extract of leaves of *Terminalia catappa*. *Acad Res Int.* 2011;1:362-71.

18. Terças AG, Monteiro AS, Moffa EB, Dos Santos JRA, de Sousa EM, Pinto ARB, Monteiro CA. Phytochemical Characterization of *Terminalia catappa* Linn. Extracts and Their antifungal Activities against *Candida* spp. *Front Microbiol.* 2017;10(8):595.
19. Chanda S, Rakholiya K, Dholakia K, Baravalia Y. Antimicrobial, antioxidant, and synergistic properties of two nutraceutical plants: *Terminalia catappa* L. and *Colocasia esculenta* L. *Turk J Biol.* 2013; 37:81-91.
20. CLSI Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A3. CLSI, Pennsylvania, USA. 2008.
21. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, Sekawi Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J.* 2011;5: 96-106.
22. Cunha MG, Franchin M, Galvão LCC, Bueno-Silva B, Ikegaki M, Alencar SM, Rosalen PL. Apolar Bioactive Fraction of *Melipona scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. *Evid-Based Comp and Alter Med.* 2013;256287:7.
23. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4168-70.

24. Chen PS, Li JH, Liu TY, Lin TC. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett.* 2000;52, 115-22.
25. Lim SH, Darah I, Jain K. Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *J Trop Forest Sci.* 2006;18:59-65.
26. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry.* 2005;66:2012-31.
27. Ahn YJ, Lee HS, Oh HS, Kim HT, Lee YH. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2005;30:105-12.
28. Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chem.* 2007;100:1044-8.
29. Ozcelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids flavonoids and phenolic acids. *Pharm Biol.* 2011;49: 396-402.
30. Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. Potential use of phenolic acids as anti-candida agents: a review. *Front Microbiol.* 2015;6:1420.

## ANEXO

### METODOLOGIA DETALHADA

#### Preparo de extrato

As folhas de *T. catappa* L. foram cultivadas no campo experimental da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil. A amostra foi coletada de Janeiro de 2016 a setembro de 2016. A exsicata foi preparada e enviada ao Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão para identificação botânica. As folhas foram secas separadamente em uma estufa com circulação de ar de 37°C durante 48 horas, seguidas de trituração em um moinho (Figura 1). O material seco e triturado (aproximadamente 200g) foi macerado com etanol 70% durante 24 horas, à temperatura ambiente (Figura 2A). Este processo foi repetido quatro vezes, e o extrato obtido foi filtrado (Figura 2B e 2C) e depois concentrado utilizando rotaevaporador (Figura 3A). O resíduo seco (Figura 3B) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 4<sup>A</sup>) até uma concentração final de 100 mg/mL, filtrado em membrana de 0,22 µg/mL (Figura 4B) e mantidos em frascos âmbar esterilizados a 4°C.



Figura 1. Secagem das folhas

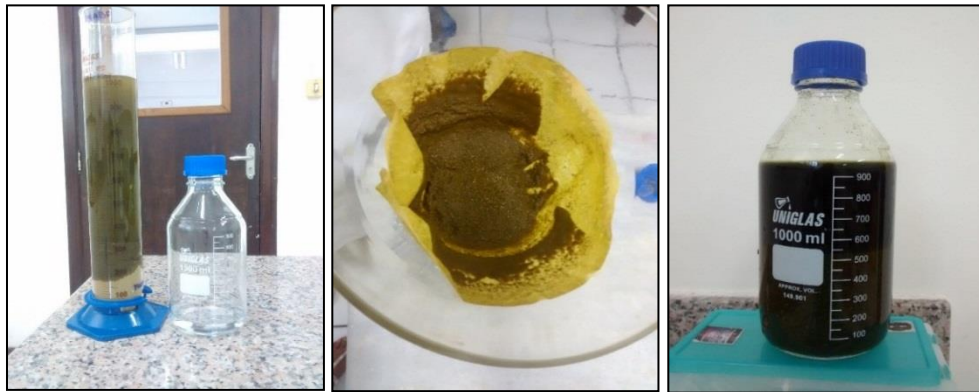


Figura 2. (A) Maceração, (B) filtragem e (C) obtenção do extrato bruto.



Figura 3. (A) Concentração em rotaevaporador e obtenção do (B) resíduo seco.

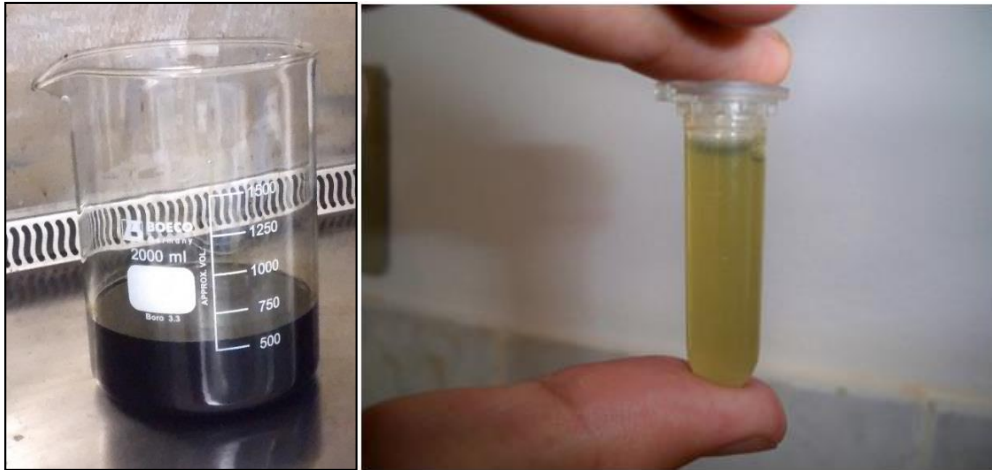


Figura 4. (A) Diluição em DMSO e (B) obtenção do extrato após filtragem em membrana.

### Testes de susceptibilidade

Os testes CIM e CFM foram determinados usando os padrões M27-A3. Para todos os testes, o fluconazol (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como controle positivo. O PBS foi utilizado como controle negativo e o DMSO também foi utilizado para controle do solvente. A CIM foi definida como a menor concentração de TCE que foi capaz de inibir o crescimento das células visíveis a olho nú (Figura 5A). As concentrações em que o crescimento não foi visível no teste de CIM foram subcultivadas em placas de SDA e incubados a 37°C durante 48 horas (Figura 5B). CFM foi considerada a menor concentração de TCE capaz de eliminar as células fúngicas ( $\geq 99\%$  de morte).

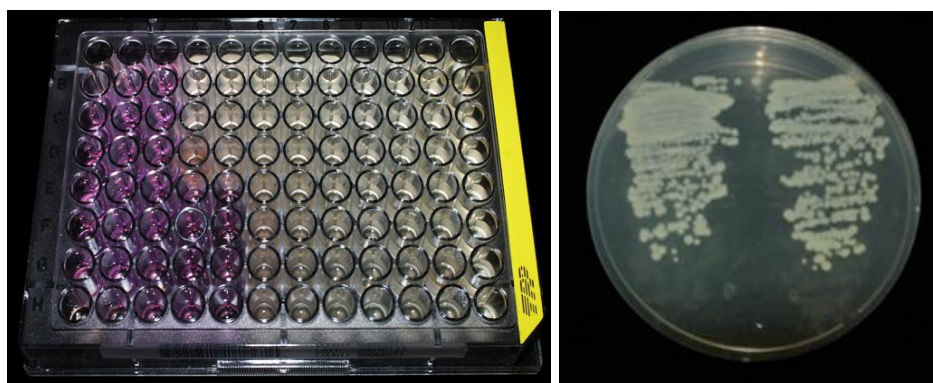


Figura 5. (A) Aspecto da placa de 96 poços após o teste de CIM e (B) aspecto da placa de cultura após subcultivo.

### **Preparo dos discos de resina acrílica**

Discos (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram fabricados utilizando uma resina acrílica para prótese dental de polimetilmetacrilato (PMMA) (VipiCril Plus, Vipicril, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante (Figura 6A). Os discos foram preparados usando uma matriz inoxidável nas dimensões padronizadas (Figura 6B). Para simular o lado interno de uma prótese dental, as superfícies do disco foram acabadas e polidas em politriz horizontal (modelo APL-4, Arotec, São Paulo, Brasil) usando lixas de óxido de alumínio (320, 400 e 600). A rugosidade superficial de todos os discos foi analisada por um rugosímetro (Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão) (Figura 7). Para cada superfície foram realizadas três medidas, a média para cada disco foi calculada e a rugosidade da superfície foi padronizada a  $0,31 \pm 0,05 \mu\text{m}$ . Após, os discos foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 1,0% durante 3 minutos para remover contaminantes.





Figura 6. (A) Resina acrílica termo-polimerizável utilizada e (B) inserção da resina manipulada na matriz de inox para confecção dos discos.

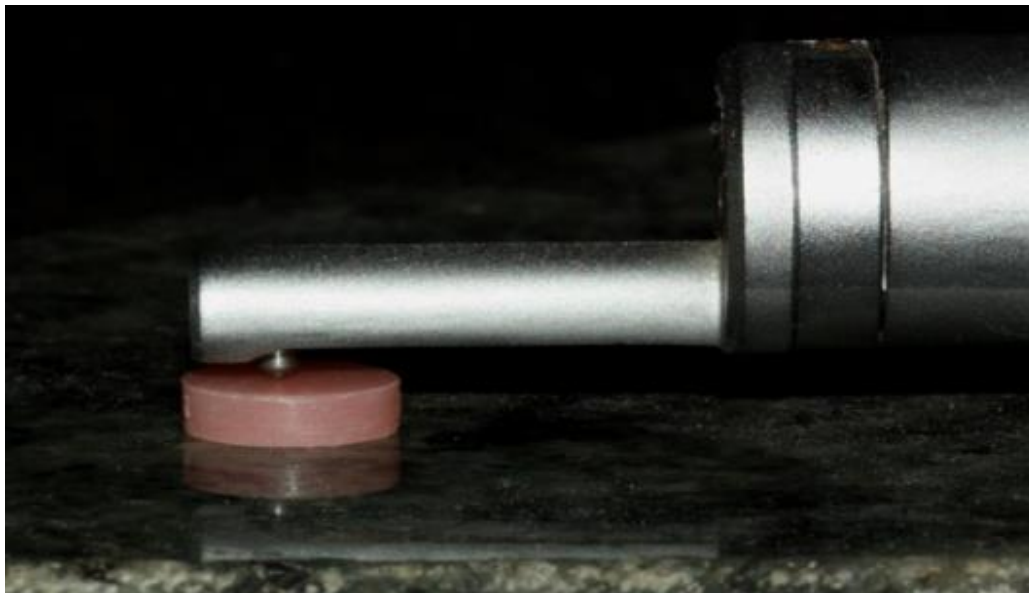


Figura 7. Mensuração da rugosidade de superfície.

## Reativação de *C. albicans*

*C. albicans* (ATCC 90028) foi cultivada aerobiamente em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA, Difco, Detroit, MI, EUA) durante 24 horas a 37°C (Figura 8A). Uma amostra destas células foram inoculadas em meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB; Difco, Detroit, MI, EUA), suplementado com glicose 100 mM, e incubadas a 37°C. Durante a fase de crescimento exponencial (isto é, após 18-20 horas de incubação), as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salina (PBS). O inóculo foi preparado a partir destas células em YNB suplementado com glicose 50 mM, e padronizado utilizando espectrofotômetro até atingir uma quantidade de  $\sim 10^7$  células/mL (OD = 0,25 a 520 nm) (Figura 8B).

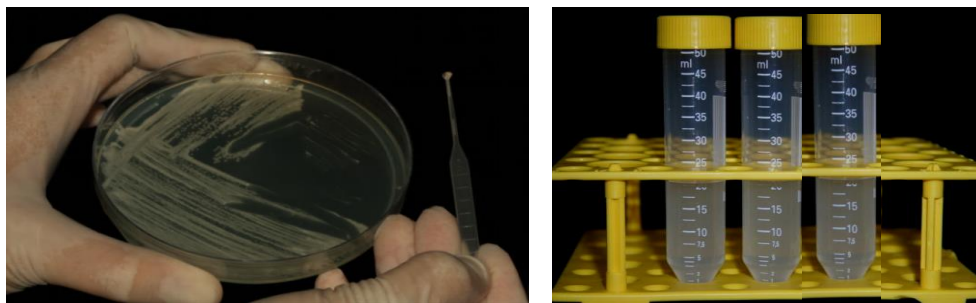


Figura 8. (A) Reativação das células de *C. albicans* a partir de uma cultura em SDA e (B) inóculo ajustado em YNB 50 mM glicose.

## Desenvolvimento de biofilmes

Sob condições assépticas, cada disco foi inserido em uma placa de cultura de 24 poços e uma alíquota de inóculo de *C. albicans* previamente ajustado ( $\sim 10^7$  células/mL) foi adicionada a cada poço. A placa de cultura foi incubada aerobiamente a 37°C durante 24 horas para desenvolvimento dos biofilmes (Figura 9). Os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS para remover células não aderentes e imersos 8 horas a 37°C nos seguintes tratamentos: PBS (controle), TCE em CIM, 5xCIM ou 10xCIM. A análise dos biofilmes foi realizada através da contagem de células e microscopia de fluorescência



Figura 9. Discos de resina acrílica na placa de cultura.

## Contagem de Células

Para a contagem de células, os discos foram lavados duas vezes com PBS e sonicados (7 W, por 30s) para permitir a desagregação da estrutura do biofilme (Figura 10<sup>A</sup>). As soluções obtidas foram submetidas a diluição decimal seriada e semeadas em placas de SDA. As placas foram incubadas aerobiamente durante 24 horas a 37°C. Após, as células foram contadas com o suporte de um estereomicroscópio e transformadas em células/mL (Figura 10<sup>B</sup>).

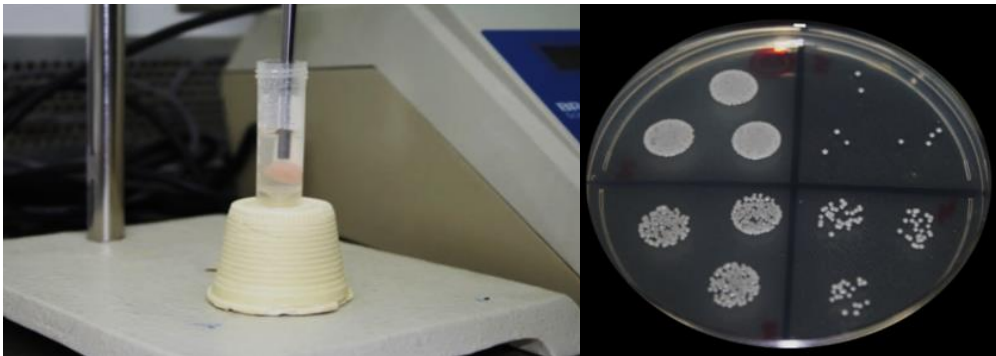


Figura 10. (A) Disco submetido a sonicação para desagregação do biofilme e (B) células para contagem celular.



## Manuscript preparation

Title page

Forename(s) and surnames of authors (see Authorship section below)

Author affiliations: department, institution, city, state, country

ORCID number(s) for all authors whenever available

Abstract

There are two types of abstracts - structured and unstructured. Original research papers require a structured abstract. Both types of abstracts should be no more than 300 words.

Plain Language Summary (optional)

Academic articles are generally written in a specific manner and aimed at communities of experts. It can be extremely difficult for lay audiences or people not familiar with the field of study to understand those articles.

One way to bridge the gap between providing open access to knowledge and improving its understanding is to provide an easily understandable, stand-alone plain language summary alongside the published research article. As Professor Sir Mark

Walport said “Science is for everyone. It’s not just to be shared within a small, closed community. We are in the middle of an information revolution, which has been made possible by Open Access and electronic publications. Plain-English summaries are the way of the future” (Keynote speech, Access to Understanding competition awards ceremony 2014).

Not only it is useful for researchers to write plain language summaries of their articles to make them accessible to a wider audience but they can also make research accessible to professionals in nearby disciplines. Crucially, plain language summaries are beneficial to improve public engagement with science and medical research. By helping the public to understand biomedical research, researchers can contribute to raising awareness of its value and attracting further public support and involvement. Plain language summaries can help connect researchers with those, who are directly and indirectly impacted by the outcomes of the research thereby helping scientists understand the needs of patients, carers, health professionals, and other members of the public. In turn, better understanding of biomedical research can inform future research directions and funding priorities as well as increase recruitment to clinical trials.

As an author, promoting your work in an engaging way to a wider audience can help you:

- Attract more readers
- Potentially increase the number of citations to your articles
- Get noticed
- Build a strong reputation
- Connect with patients, carers, politicians, policy-makers and other decision-makers
- Attract more funding opportunities
- Expand your professional network

The plain language summary should have between 150 and 250 words, be written in plain English, and be placed after the Abstract and before the Introduction. The plain language summary should be distinct from the abstract and should be written in an accessible, interesting way without spinning or exaggerating the story.

- The plain language summary should not be a “dumbed down” version of your work. You must not treat your audience as stupid or patronise the reader.
- Provide answers to the questions: Why was the study done, What did the researchers do and find, What do these results mean?
- Communicate the facts in an interesting way and put them in the appropriate context.
- Use short, clear sentences broken up into paragraphs for readability. You may use bullet points.
- Use the active voice rather than the passive voice (for example, “Dr Smith’s team report several improvements” rather than “Several improvements were reported by Dr Smith’s team”).
- Avoid jargon, complex grammatical structures or abbreviations. You should use everyday English words rather than complex words. If you need to use a technical term or abbreviation, please explain it the first time you use it.
- Phrase sentences in a positive manner rather than negatively.
- Use person-centred language rather than focussing on the condition/illness or disability.
- Ask someone, who doesn’t have any knowledge of the subject, to read your plain language summary and provide feedback. They should find it interesting and they should be able to understand what your study was, what the conclusions are and what the impact of the research may be.

For further information on how to write about biomedical and health research in plain English, please read the Access to Understanding Writing Guidance or the INVOLVE Plain English Summaries resource from the National Institute for Health Research.

Keywords

3–6 keywords

Running header (shortened title)

Corresponding author

Name, physical address, phone, fax, email

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

Conclusions

Abbreviations (if any)

Ethics approval and informed consent

Manuscripts reporting studies on human subjects, human data or tissue, or animals should include a statement on ethics approval and consent when humans are involved. Please include the name of the committee that approved the study and reference number if appropriate. Please see our editorial policies for more information.

Consent for publication

In cases where details, images, or videos relating to individual participants are included in the manuscript, authors should have obtained written informed consent to publish the details from the participant or parent/guardian. Authors should add a statement to this effect here. Authors should be able to provide such signed consent if required by the Editor.

Data availability (where applicable)

Please include a statement about where data supporting the results reported in the manuscript can be found and about data sharing including, where applicable, links to the publicly archived datasets. The statement of data availability should explain which additional unpublished data from the study, if any, are available, to whom, and how these can be obtained. In cases where authors do not wish to share their data or are unable to do so, they should state that data will not be shared and the reasons why. Please refer to our editorial policies for further information.



## Funding

Please declare all the sources of funding including financial support. Please describe the role of the sponsor(s), if any, in any of the stages from study design to submission of the paper for publication. Please state if the sponsor(s) had no such involvement.

## Competing interests

Your relationship with other people or organisations may influence the way you interpret data or present the information your study demonstrated. This is known as a competing interest.

For transparency, authors are required to complete a declaration of competing interests.

The author(s) of a paper submitted to any Dove Medical Press journal are required to complete a declaration of competing interest for any commercial associations or financial interests held by the author or immediate members of the author's family, which might be construed as posing a conflict of interest, including but not limited to consultancies, employment, expert testimony, honoraria, retainers, stock holdings or options, and membership on boards of for-profit organizations with a financial interest in the paper. All competing interests will be listed in the declarations at the end of the article.

Please consider the following questions when completing your competing interest declaration:

### Financial competing interests

In the past three years have you received any funding from an organization that may have a financial interest in the manuscript? If so, please specify.

Do you hold any stock holdings or options in an organization that may have financial interest in the publication of this manuscript? If so, please specify.

Does the content of the manuscript relate to any patents you hold or are you currently applying for? If so, please specify.

Have you received any funding or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.

Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

### Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests to declare in relation to this manuscript? Examples of non-financial competing interests include family associations, political, religious, academic or any other.

If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editor.

Dove Medical Press subscribes to the general intent of the principles adopted by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on the control of data in publications arising from sponsored research. The author submitting a manuscript for a paper for any study funded by an organization with a proprietary or financial interest in the outcome shall have access to all the data in that study, and to have complete responsibility for the integrity and accuracy of the data, and the decision to publish.

### Authors' contributions

According to the IMCJE guidelines, authorship credit should be based on:

<http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>

1. Substantial contributions to conception and design, data acquisition, or data analysis and interpretation;
2. Drafting the article or critically revising it for important intellectual content;
3. Final approval of the version to be published; and
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of the work are appropriately investigated and resolved.

Authors should meet conditions 1, 2, 3, and 4 and appropriate credit for each author's contribution should be given.

Acquisition of funding, data collection, or general team supervision alone does not constitute authorship.

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed.

Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Increasingly, authorship of multicenter trials is attributed to a group. All members of the group who are named as authors should fully meet the above criteria for authorship/contributorship.

The group should jointly make decisions about contributors/authors before submitting the manuscript for publication. The corresponding author/guarantor should be prepared to explain the presence and order of these individuals. It is not the role of editors to make authorship/contributorship decisions or to arbitrate conflicts related to authorship.

#### Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chairperson who provided only general support. Authors should declare whether they had assistance with study design, data collection, data analysis, or manuscript preparation. If such assistance was available, the authors should disclose the identity of the individuals who provided this assistance and the entity that supported it in the published article. Financial and material support should also be acknowledged.

Groups of persons who have contributed materially to the paper but whose contributions do not justify authorship may be listed under such headings as “clinical investigators” or “participating investigators,” and their function or contribution should be described—for example, “served as scientific advisors”, “critically reviewed the study proposal”, “collected data”, or “provided and cared for study patients”. Because readers may infer their endorsement of the data and conclusions, these persons must give written permission to be acknowledged.

For individual members of a collaboration group to be searchable through PubMed (for those journals listed on PubMed), please ensure that the title of the collaboration group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the “Acknowledgements” section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name.

As it takes PubMed additional time to code these groups these may not be present when an article is initially included on PubMed.

Please note: the Authorship and “Contributors Listed in Acknowledgments” sections are reprinted from the ICMJE Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Dove Medical Press prepared this reprint. The ICMJE has not endorsed nor approved the contents of this reprint. The official version of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals is located at <http://www.icmje.org/>. Users should cite this official version when citing the document.

#### Authors' information (optional)

Information about the author(s) that may be relevant to the interpretation of the article may be listed here. This may include the authors’ affiliations, qualifications or other relevant background information. This section does not list any competing interests.

#### References

See Reference Style Guidelines

#### Figures and tables

Submit as separate files and also as one combined file

Submit figures as JPG files

All figures and tables must be in English

Number consecutively

Provide a descriptive heading/legend

Place abbreviations immediately below the table

Use superscript a, b, c... as identifiers

Supply Line Art 900 dpi, Combination (Line Art + Halftone) 900 dpi, Halftone 300 dpi

Graphics downloaded from Web pages are NOT acceptable

Submit multi-panel figures, ie with parts labeled a,b,c,d, as one file