

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Eugenia pyriformis*
Cambess (MYRTACEAE) CONTRA *Streptococcus mutans***

Ana Paula Venter Soares

Lajeado, junho de 2016

Ana Paula Venter Soares

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Eugenia pyriformis*
Cambess (MYRTACEAE) CONTRA *Streptococcus mutans***

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia
do Centro Universitário Univates, para
viabilização do Título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur
Co-orientadora: Profa. Ma.Carla Kauffmann

Lajeado, junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Em especial à minha família;

Aos meus pais, Ingrid e Luiz, pois sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

Sempre tiveram paciência nos momentos de dificuldade. E sempre estiveram a postos para me orientar, levar, buscar, pagar e amparar quando necessário!

À minha irmã, Júlia Carolina, pois é minha maior confidente, e sempre me faz rir!

À todos que me amam incondicionalmente, me mostrando o melhor da vida e real significado da palavra família, muito obrigada! Vocês são o meu exemplo!

Ao meu orientador, Eduardo Miranda Ethur, pelas horas dedicadas a mim e a este trabalho, pela confiança e compreensão.

À minha co-orientadora, Carla Kauffmann, que sempre me atendeu nos momentos de urgência, sanando minhas dúvidas e dando o suporte necessário para realização deste trabalho.

À minha colega e amiga, Bárbara Buhl, por me auxiliar na realização de todos os ensaios práticos deste trabalho, com muita dedicação e paciência.

Às minhas colegas e amigas, Alana Ledur, Cibele de Fátima de Oliveira da Silva, Kelen Arossi, Leandra Andressa Pacheco e Talita Scheibel pela orientação nos ensaios práticos e desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos laboratoristas, Anderson Luiz Klein, Gabriel Luís Viecelin Caumo e Raquel Mallmann, pela assistência nos ensaios práticos.

Realizei este trabalho com todo meu empenho e dedico a todos mencionados acima.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho descreve um estudo realizado com extratos vegetais preparados a partir de folhas da espécie *Eugenia pyriformis* Cambess (Myrtaceae), nativa do Rio Grande do Sul. Será apresentado sob forma de artigo, que após avaliação da banca, e feitas as devidas correções, será traduzido para o idioma inglês e encaminhado à revista “Journal of Applied Microbiology” (ANEXO I). As normas para publicação da revista estão descritas no Anexo II.

Em relação ao projeto apresentado no TCC I, o texto mencionava a realização de um ensaio *in vitro* com escovas dentárias, porém a metodologia proposta não se mostrou adequada, devido á forte coloração dos extratos que interferiu na avaliação dos resultados, já que não foi possível avaliar de forma inequívoca a ação antimicrobiana e o uso de concentrações mais baixas de extrato, diminuindo a coloração, também não seria adequado optou-se por retirar esse ensaio do artigo final.

ANEXO I

Artigo a ser encaminhado à revista Journal of Applied Microbiology.

Ação antimicrobiana de extratos de *Eugenia pyriformis* Cambess (MYRTACEAE) contra *Streptococcus mutans*

A. P. V. Soares¹, E. M. Ethur², B. Buhl¹ e C. Kauffmann¹.

1 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil

2 Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil

Correspondência

Centro Universitário UNIVATES, Avelino Tallini 171, Bairro Universitário, 95900-000, Lajeado, RS, Brasil. E-mail: eduardome@univates.br (E.M. Ethur)

Significado e impacto do estudo: A cárie dental é reconhecida como uma doença infectocontagiosa e seu desenvolvimento ocorre principalmente pela formação de biofilme por *Streptococcus mutans*. Extratos obtidos através de folhas de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae) apresentaram potencial antimicrobiano na formação do biofilme dentário, o que demonstra que estudos incentivando a busca pelos possíveis mecanismos de ação destes extratos são promissores.

Resumo

A formação de biofilme por bactérias é responsável por inúmeras infecções crônicas, as quais não são sensíveis aos antibióticos tradicionais. Comumente, a formação de biofilme relaciona-se também ao desenvolvimento de cárie dental

causada por *Streptococcus mutans*. O potencial antibiofilme dos extratos aquoso e etanólico de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae) contra *S. mutans* foi avaliado utilizando modelo de material hidrofóbico em microplacas de poliestireno com 96 poços em concentrações de 0,4 e 4,0 mg/mL de extrato. Ainda, utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Para ambos os extratos os valores de CIM e CBM foram de 1,25 mg/mL e 2,50 mg/mL, respectivamente. Os extratos apresentaram atividade antibiofilme, demonstrando, na concentração de 4,0 mg/mL, uma inibição de 95,74% no extrato aquoso e 93,25% no etanólico. O extrato aquoso inibiu ainda, nesta mesma concentração, 98,31% do desenvolvimento das bactérias planctônicas.

Palavras chave

biofilme, antimicrobianos, cárie dental, *Streptococcus mutans*, *Eugenia pyriformis*
Cambess

Introdução

O biofilme se constitui em uma comunidade estruturada de células microbianas, alocadas em uma matriz polimérica, formada por proteínas, polissacarídeos e DNA microbiano extracelular, com capacidade de se aderir a superfícies inertes ou vivas. Esta matriz pode ainda abrigar mais de uma espécie microbiana e fornece estabilidade estrutural e proteção, além de ter o poder de causar infecções crônicas de pouca resposta a antibioticoterapia convencional (Taraszkievicz *et al.* 2013).

A formação de biofilme está relacionada ao desenvolvimento de cárie dental (Macedo-Costa *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2011). A cárie se origina da perda mineral

localizada, cuja causa é a presença de ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta (Loesche 1993). Formado por uma comunidade de microrganismos que se aderem à superfície dental, no biofilme dentário destaca-se a espécie de bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*. Para o tratamento de doenças bucais, o antisséptico de escolha é a clorexidina, porém ela provoca descoloração dos dentes, ulceração da mucosa oral, alteração da percepção gustativa e ainda, no caso de uso diário prolongado, resistência (Macedo-Costa *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2011).

Para o controle do biofilme, muitas substâncias antimicrobianas são utilizadas. Entre elas destacam-se as substâncias naturais, que tem se constituído numa alternativa biologicamente viável, por serem muitas vezes amplamente disponíveis e obtidas a partir de processos de baixo custo (Vieira 2005).

Para realização dos ensaios práticos optou-se por trabalhar com a família Myrtaceae, que faz parte das principais famílias da flora brasileira e do ponto de vista taxonômico, é uma das mais complexas, tanto pelo grande número de espécies quanto pela escassez de estudos (Souza e Lorenzi 2012).

Eugenia pyriformis Cambess é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul popularmente conhecida como uvaia, uvaieira ou uvalha. Nas folhas e nas hastes estão presentes compostos fenólicos, drusas e cristais de oxalato de cálcio (Lorenzi 2002; Govaerts *et al.* 2008; Armstrong *et al.* 2012). Ramirez e colaboradores (2012) demonstraram em um estudo que o extrato etanólico dos frutos de *E. pyriformis* apresenta atividade antioxidante *in vitro* e anti-inflamatória *in vivo*, apresentando assim, potencial para o desenvolvimento de compostos anti-inflamatórios. O presente trabalho é o primeiro a apresentar a ação antimicrobiana e antibiofilme de extratos de folhas da espécie *E. pyriformis*.

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano da espécie *E. pyriformis* contra *S. mutans*. Através da análise da atividade antibiofilme *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), *in vitro*, destes extratos.

Resultados e discussão

Extratos e Perfil Fitoquímico de *E. pyriformis*

O extrato aquoso das folhas de *E. pyriformis* obteve rendimento de 11,38% e o extrato etanólico rendeu 18,40%.

A partir da análise fitoquímica foi possível verificar a presença de compostos fenólicos em ambos os extratos analisados (Tabela 1). Taninos e saponinas foram observados, sendo que a presença de taninos também está descrita em diferentes espécies do gênero *Eugenia*, como *E. grandis* Wight (Nonaka *et al.* 1987) e *E. uniflora* L. (Lee *et al.* 1997).

Terpenos foram verificados somente no extrato etanólico. Alcaloides não foram observados em nenhum dos extratos analisados, contudo, em análise realizada por Chavasco *et al.* (2014) em *E. pyriformis*, coletada no estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil, foi identificada a presença de alcaloides em folhas e sementes, através de reações de precipitação com os reagentes de Mayer, Bertrand, Dragendorff e Bouchardat.

Tabela 1 Metabólitos secundários dos extratos aquoso e etanólico de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae) nativa do sul do Brasil.

Classe de metabólito secundário	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Alcaloides	–	–
Antraquinona	–	–
Cumarinas	–	–
Flavonoides	–	–
Terpenos	–	+
Taninos	+	+
Saponinas	+	+

(–) metabólito não encontrado (+) metabolito encontrado

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Os extratos aquoso e etanólico de *E. pyriformis*, apresentaram atividade bacteriostática *in vitro* contra *S. mutans* até a concentração de 1,25 mg/mL, e ação bactericida até a concentração de 2,50 mg/mL.

Ensaio com o extrato aquoso de folhas de limão kaffir [*Citrus hystrix* (DC)] demonstraram inibição do crescimento de *S. mutans* até a concentração de 125 mg/mL (Kooltheat *et al.* 2015). Ainda, ensaios com extrato etanólico de própolis inibiram o crescimento de *S. mutans* até a concentração de 2,08 mg/mL (Cardoso *et al.* 2016).

Embora os extratos utilizados neste trabalho sejam de polaridades diferentes tanto o CIM como o CBM foram iguais, o que sugere que a ação antimicrobiana

pode estar relacionada com os metabólitos secundários mais polares, comuns em ambos os extratos.

Análise da atividade antimicrobiana e inibidora de formação de biofilme

Os resultados encontrados para o extrato aquoso de *E. pyriformis* (Tabela 2), demonstram que o crescimento das bactérias planctônicas de *S. mutans* na concentração 4,0 mg/mL foi de apenas 1,69%, portanto, houve uma inibição de 98,31%; nesta mesma concentração, o extrato etanólico inibiu 78,75%. Na concentração mais baixa de 0,4 mg/mL os resultados não foram tão expressivos, apresentando inibição de 18,11% no extrato aquoso e nenhuma inibição no extrato etanólico.

A formação de biofilme na concentração de 4,0 mg/mL, foi de 4,26% no extrato aquoso, praticamente metade da encontrada na concentração de 0,4 mg/mL do mesmo extrato (Tabela 2); havendo assim uma inibição de 95,74% na concentração de 4,0 mg/mL e 91,31% na concentração de 0,4 mg/mL. O extrato etanólico na concentração de 4,0 mg/mL apresentou uma inibição de 93,25% da formação de biofilme, esse resultado não foi tão expressivo na concentração de 0,4%, havendo inibição de apenas 35,65% das bactérias sésseis.

Tabela 2 Atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e etanólico de *Eugenia pyriformis* contra *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

<i>Eugenia pyriformis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>			
	Crescimento bacteriano (%)		Formação de Biofilme (%)	
	4,0 mg/mL	0,4 mg/mL	4,0 mg/mL	0,4 mg/mL
Extrato Aquoso	1,69± 0,22*	81,89± 10,43*	4,26± 0,38*	8,69± 1,16*
Extrato Etanólico	21,25± 3,32*	117,79± 12,85*	6,75± 1,27*	64,35± 3,44*

*diferença significativa em relação ao controle de crescimento ($p \leq 0.05$).

O biofilme dentário se constitui em uma comunidade estruturada de células microbianas, que se aderem à superfície dental e fornecem estabilidade estrutural e proteção (Taraszkiwicz *et al.* 2013). Deste modo, na leitura da placa, a detecção das bactérias planctônicas é interferida pela camada formada pelo biofilme. No ensaio para avaliação da CIM essa interferência não existe; por isso os resultados se apresentaram aparentemente melhores que os do biofilme, mesmo em concentrações semelhantes.

A extinção do biofilme pode ocorrer, essencialmente, sob duas vias: compostos bactericidas, que ocasionarão a inibição do crescimento bacteriano, ou compostos bacteriostáticos, que bloquearão a adesão bacteriana. Esses últimos são os mais comumente estudados, pois inibem a formação de bactérias sésseis, sem afetar o crescimento bacteriano, mantendo assim as bactérias no seu estado planctônico, evitando o desenvolvimento de resistência e favorecendo a ação dos antibióticos existentes (Trentin *et al.* 2013; Villa e Cappitelli 2013). Em função disso a avaliação do crescimento das bactérias planctônicas juntamente à formação do

biofilme se torna indispensável para complementação dos resultados do ensaio.

Lee et al. (2011) verificaram ação antibiofilme de extratos de *Aralia continentalis* contra *S. mutans* em concentrações superiores a 2 mg/mL. Ensaio realizado com extrato etanólico de *S. lychnophora* demonstraram atividade antibiofilme nas concentrações de 0,01 a 0,04 mg/mL, porém neste ensaio a concentração microbiana inicial foi de $5,0 \times 10^5$ UFC/ml (Yang et al. 2016).

Ainda, ensaios realizados com extratos de *Dodonaea viscosa* contra *S. mutans* demonstraram que na concentração 0,1 mg/mL houve ação bactericida de 48% depois de 6 horas de exposição e 71% depois de 24 horas, contudo neste ensaio a concentração microbiana inicial também foi menor que a utilizada no presente trabalho (Naidoo et al. 2012).

Através da análise dos resultados podemos observar que em todos os ensaios, os extratos aquoso e etanólico de *E. pyriformis* apresentaram promissora ação antimicrobiana contra *S. mutans*, o que sugere que extratos vegetais podem ser uma alternativa para a substituição ou complementação da antibioticoterapia utilizada atualmente.

Considerando que ambos os extratos apresentaram os metabólitos taninos e saponinas, pode-se propor que, ao menos em parte, estes sejam os responsáveis pela ação antimicrobiana, porém para encontrar os possíveis mecanismos de ação, estudos mais minuciosos são necessários.

Sob o ponto de vista etnofarmacológico, podemos considerar ainda, que a utilização do extrato aquoso como forma de infusão (chá) poderia constituir em uma alternativa para a prevenção da formação de biofilme por *S. mutans* e contribuir para a diminuição da prevalência de cárie dental em populações carentes.

Materiais e métodos

Material vegetal

As folhas de *E. pyriformis*, foram coletadas no mês de agosto de 2015, no município de Cruzeiro do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil (Lat.: -29.988861; Long.: -52.054722 WGS84). A identificação da espécie foi realizada pela Profa. Dra. Elisete Maria de Freitas, do Centro Universitário UNIVATES. Exsicata da planta foi depositada no Herbário HVAT, do Museu de Ciências Naturais da Univates, sob código HVAT 3833.

Obtenção dos extratos

Os extratos aquoso e etanólico foram obtidos conforme Vogel *et al.* (2011). Após a remoção completa dos solventes dos extratos foi calculado o seu rendimento, em % (m/m), e em seguida, os mesmos foram armazenados à -8°C, em frascos âmbar.

Screening fitoquímico

As amostras vegetais de *E. pyriformis*, foram submetidas à *screening* fitoquímico através de cromatografia em camada delgada (CCD), empregando cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A identificação da presença de diferentes classes de metabólitos secundários foi realizada com emprego de sistema eluente e reagente de visualização específico, associada à visualização sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm, de acordo com Wagner e Bladt (1996).

Microrganismos e condições de cultura e análise

Na avaliação do potencial antimicrobiano e antibiofilme foi empregada cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). A superfície utilizada para determinar a adesão bacteriana foi um modelo de material hidrofóbico, microplacas de poliestireno com 96 poços, de fundo chato (Corning Incorporated, NY, USA).

O microrganismo foi cultivado em ágar Mueller Hinton (MH), durante 24 horas, em estufa a 37 °C. As suspensões bacterianas foram preparada em solução estéril salina a 0,85%. As concentrações microbianas foram ajustadas utilizando espectrofotômetro (Thermo Scientific, G10S-UV-VIS, EUA) em 625nm. Para o biofilme a suspensão foi ajustada para uma turbidez correspondente a 1 na escala de McFarland (3×10^8 UFC/mL), e para o ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a suspensão foi ajustada para uma turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), desta solução patronizada para a CIM foram retirados 200 µL, que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL do caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., England), obtendo-se assim o meio final com o inóculo.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Na realização dos ensaios para análise da atividade antimicrobiana foi empregada metodologia de microdiluição em caldo, preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

As amostras foram previamente diluídas em solução aquosa de dimetilsulfóxido 0,8% (DMSO, Sigma–Aldrich Co., USA) perfazendo a concentração

de 40 mg/mL. Após foram realizadas diluições seriadas nos poços A - F variando de 20 – 0,625 mg/mL de extrato. Como controle positivo foi utilizado o meio acrescido de inóculo e como controle negativo o meio sem inóculo. Também foi realizado o controle do diluente DMSO e como padrão antimicrobiano foi utilizado o antisséptico Clorexidina 0,12%.

As placas foram incubadas em estufa, a 37°C, por 24 horas. Após, foram adicionados a cada poço 30 µL de solução aquosa estéril de resazurina 0.02% para visualização do crescimento bacteriano e determinação da CIM. A fim de determinar a CBM foram realizadas semeaduras em placas contendo ágar MH de alíquotas de todos os poços onde não houve crescimento bacteriano. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C.

As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os experimentos realizados em triplicata.

Ensaio para avaliação do potencial antibiofilme

Na realização dos ensaios para análise da atividade antibiofilme foi empregada metodologia de Trentin *et al.* (2011). A cada poço da placa de microtitulação foram adicionados 80 µL da suspensão bacteriana, 40 µL de amostra dos extratos em estudo e 80 µL de caldo TSB. As amostras foram previamente diluídas em solução aquosa de DMSO 0,8% perfazendo as concentrações de 0.4 mg/mL e 4.0 mg/mL.

Foi realizada leitura das placas (tempo 0) onde a absorbância foi medida a 600 nm, em espectrofotômetro (SpectraMax i3x Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, USA). As placas foram então incubadas em estufa, a 37 °C, por 24 horas. Após o período de incubação foi realizada nova leitura (tempo 24) onde a absorbância foi medida novamente a 600 nm, em espectrofotômetro. O teor dos

poços foi removido e estes foram lavados três vezes com solução estéril salina. As placas foram colocadas em estufa a 60 °C, por uma hora, a fim de fixar o biofilme formado. O biofilme foi corado com solução de cristal violeta 0.4%, à temperatura ambiente, por 15 minutos, as placas então foram lavadas com água. Após, foram adicionados 200 µL de etanol (Synth[®], Brasil) e as placas foram mantidas em repouso por 30 minutos, foi realizada nova leitura onde a absorbância agora foi medida a 570 nm, em espectrofotômetro.

A absorbância do controle de crescimento, no qual a amostra foi substituída por 40 µL de água estéril, foi considerada como 100% de formação de biofilme, sendo a partir desta calculada a inibição de formação de biofilme pelas amostras analisadas. Valores superiores a 100% representaram uma estimulação da formação de biofilme em comparação ao controle positivo.

Ensaio de crescimento bacteriano

O crescimento das bactérias planctônicas foi determinado pela diferença entre a absorbância em 600 nm medida ao final, tempo 24 horas, e ao início do período de incubação, tempo 0 hora, em espectrofotômetro.

No controle do crescimento bacteriano foram adicionados 40 µL de água estéril em substituição a amostra, sendo este considerado como 100% de crescimento bacteriano planctônico. Valores superiores a 100% representaram estimulação do crescimento bacteriano em relação ao controle. Clorexidina 0,12% foi empregada como controle de inibição do crescimento bacteriano.

Análise estatística

As amostras foram analisadas em quadruplicata, sendo os experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem média \pm desvio-padrão. A significância das diferenças entre as amostras foi calculada por teste t de Student, empregando o software BioEstat 5.0, considerando-se como diferença significativa os valores de $p \leq 0,05$.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Elisete Maria de Freitas pela assistência na identificação da planta. O estudo foi parcialmente financiado pela FAPERGS e CNPq através do edital PRONEX nº 008/2009 (Projeto 10/0029-0).

Conflito de interesses

Nenhum conflito de interesse declarado.

Referências

- Armstrong, L., Duarte, M. R. e Miguel, O. G. (2012) Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **22**, n. 3, 475-481.
- Cardoso, J. G., Iorio, N. L. P., Rodrigues, L. F., Couri, M. L. B., Farah, A., Maia, L. C. e Antonio, A. G. (2016) Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Archives of Oral Biology* **65** (2016), 77–81.

- Chavasco, J.M., Prado e Felipe, B.H.M., Cerdeira, C.D., Leandro, F.D., Coelho, L.F.L., Da Silva, J.J., Chavasco, J.K. e Dias, A.L.T. (2014) Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado. *Inst. Med. Trop. São Paulo* **56**,13-20.
- CLSI (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Govaerts, R., Sobral, N., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.L., Matsumoto, K., Mazine, F., Lughadha, E. e Proença, C. (2008) World Checklist of Myrtaceae: 1-455. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Kooltheat, N., Kamuthachad, L., Anthapanya, M., Samakchan, N., Sranujit, R. P., Potup, P., Ferrante, A. e Usuwanthim, K. (2015) Kaffir lime leaves extract inhibits biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Nutrition* **32** (2016), 486-490.
- Lee, M.H., Nishimoto, S., Yang, L.L., Yen, K.Y., Hatano, T., Yoshida, T. e Okuda, T. (1997) Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry* **44**, 1343-1349.
- Lee, D., Seo, B., Kim, H., Gum, G., Yu, H., You, H., Kang, T. H. e You, Y. (2011) Inhibitory effect of *Aralia continentalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology* **137**, 979– 984.
- Loesche, W.J. (1993) Cárie dental: uma infecção tratável. Rio de Janeiro, Cultura Médica.
- Lorenzi, H. (2002) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 277.

- Macedo-Costa, M. R., Diniz, D. N., Carvalho, C. M., Pereira, M. S. V., Pereira, J. V. e Higino, J. S. (2009) Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**, n. 2B, 565-571.
- Naidoo, R., Patel, M., Gulube, Z. e Fenyvesi, I. (2012) Inhibitory activity of *Dodonaea viscosa var. angustifolia* extract against *Streptococcus mutans* and its biofilm. *Journal of Ethnopharmacology* **144**, 171–174.
- Nonaka, G.I., Ishimaru, K., Watanabe, M., Nishioka, I., Yamauchi, T. e Wan, A.S.C. (1987) Tannins and related compounds. LI. Elucidation of the stereochemistry of the triphenoyl moiety in castalagin and vescalagin, and isolation of 1-O-galloyl castalagin from *Eugenia grandis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **35**, 217-220.
- Oliveira, A.C.M., Fontana, A., Negrini, T.C., Nogueira, M.N.M., Bedran, T.B.L., Andrade, C.R., Spolidorio, L.C. e Spolidorio, D.M.P. (2011) Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev. Bras. Pl. Med.* **13**, n.4, 492-499.
- Ramirez, M. R., Schnorr, C. E., Feistauer, L. B., Apel, M., Henriques, A. T., Moreira, J. C.F. e Zuanazzi, J. Â. S. (2012) Evaluation of the polyphenolic content, anti-inflammatory and antioxidant activities of total extract from *Eugenia pyriformes* cambess (uvaia). *Journal of Food Biochemistry* **36**, n. 4, 405–412.
- Souza, V. C. e Lorenzi, H. (2012) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 428-429.

- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M. e Nakonieczna, J. (2013) Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *BioMed Research International*, Article ID 150653, 13 pages.
- Trentin, D.S, Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Silva, A.G., Da Silva, M.V., Correia, M.T.S., Baumvol, I.J.R. e Macedo, A.J. (2011) Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* **137**, 327-335.
- Trentin, D.S, Giordani, R.B. e Macedo, A.J. (2013) Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Liberato* **14**, 113-238.
- Vieira, L.B. (2005) Eficácia do Bochecho de Quitosana a 0,4% sobre o Biofilme e Bactérias Orais. 97f. Dissertação (Pós-Graduação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- Villa, F. e Cappitelli, F. (2013) Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations: towards smart biocide-free antibiofilm strategies. *Phytochem Rev* **12**, 245-254.
- Wagner, H. e Bladt, S. (1996) *Plant drug analysis*, second ed. Springer Verlag, New York, USA. 384 pp.
- Yang, Y., Park, B., Hwang, E. e You, Y. (2016) Composition Analysis and Inhibitory Effect of *Sterculia lychnophora* against Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016**, Article ID 8163150, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8163150>.

ANEXO II

Normas para publicação na revista *Journal of Applied Microbiology*.

Author Guidelines

Journal of Applied Microbiology publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

In 2009, *Journal of Applied Microbiology* updated its Aims and Scope and will now publish only the top 25% of research. [Click here to read the Editorial announcing the new Aims and Scope.](#)

CONTACTS AND QUICK LINKS

[Author submission checklist](#)

[Contact the Editorial Office](#)

[Contact the Production Editor](#)

[Submit your manuscript now to *Journal of Applied Microbiology*](#)

[Click here to download the Colour Work Agreement Form](#)

[Guidelines for Electronic Graphics](#)

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Review Articles

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief

Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Journal of Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover

letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the [ARRIVE guidelines](#) before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Biosecurity

The Journal asks authors of papers related to [Schedule 5 biological agents](#) to inform the Editor at the time of manuscript submission if their study has the potential for both benevolent and malevolent application. This is often referred to as “dual use research of concern”. The [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines state that a “dual use research of concern” can arise in relation to “research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material”.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance

with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. "E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)". Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, [MicrobiologyOpen](#) and [Food Science & Nutrition](#) to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science &*

Nutrition are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. For review purposes submitted papers (both original and revised articles) must be formatted with continuous line numbering and double spaced text throughout. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether you manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer):

1. How does this work fits the Aims and Scope of the Journal?
2. In what way is this work novel?

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the [author submission checklist](#) to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**
- **SUPPORTING INFORMATION (if applicable):** Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors

should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared in the same format as the manuscript text, and should ideally appear at the end of the main manuscript file. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

Figures should be uploaded to the online submission site as separate files. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style, [click here](#). Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a 'Save as...' or 'Export...' feature to allow you to do this
- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi
- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for printed colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from [here](#) and should be sent to the provided address on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N);

probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (**g**). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#).

All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.