



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUILHERME DOS SANTOS GOMES ALVES

**BIOFILME MISTO DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* E *CANDIDA ALBICANS*:
ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO *IN VITRO* E
COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTIBIOFILME ENTRE FÁRMACOS DE
REFERÊNCIA E GENÉRICOS**

Presidente Prudente - SP
2024

GUILHERME DOS SANTOS GOMES ALVES

**BIOFILME MISTO DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* E *CANDIDA ALBICANS*:
ESTABELECIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MODELO *IN VITRO* E
COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTIBIOFILME ENTRE FÁRMACOS DE
REFERÊNCIA E GENÉRICOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador:

Professor Dr. Douglas Roberto Monteiro

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.969 3 Alves, Guilherme dos Santos Gomes.
A474b Biofilme misto de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*: estabelecimento e validação de um modelo in vitro e comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos / Guilherme dos Santos Gomes Alves ; orientador: Douglas Roberto Monteiro– Presidente Prudente, 2024.

66 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2024.

Bibliografia.

1. Amoxicilina. 2. Biofilmes. 3. *Candida albicans*. 4. Candidíase. 5. Medicamentos de Referência. 6. Tonsilite. I. Monteiro, Douglas Roberto, orient. II. Título.

GUILHERME DOS SANTOS GOMES ALVES

**Biofilme misto de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*:
estabelecimento e validação de um modelo *in vitro* e comparação do efeito
antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 16 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Caio Sampaio
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp
Araçatuba - SP

Profa. Dra. Daniela Vanessa Moris de Oliveira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Gabriella, o amor da minha vida, a quem divido minhas alegrias, tristezas, dúvidas e incertezas.

À minha família, incluindo meus pais, minha irmã, meus tios e primos, minha amada avó e meu sogro e minha sogra, por sempre estarem comigo em todos os momentos que foram necessários. Sem vocês, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças para concluir este projeto de forma satisfatória, sem Ele nada seria possível.

À minha esposa Gabriella, agradeço pelo seu amor incondicional, sua presença constante em minha vida e por sempre me apoiar nas minhas escolhas. Você é meu porto seguro e para sempre será minha melhor companhia.

Ao meu pai Geraldo, minha mãe Lizandra e minha irmã Ana Beatriz, agradeço por todo o amor e carinho por sempre depositado em mim, assim como pelos ensinamentos e por todas as experiências que vocês puderam me proporcionar. Vocês são a minha base e tudo que eu sou hoje, devo a vocês.

À minha avó Val, meus tios Fred e Priscila, e primos Antônio e Heloísa, agradeço pelo carinho e pelo incentivo de sempre, amo vocês e contem sempre comigo.

Ao meu sogro Viola e sogra Zulma, por nos últimos dias poderem ter acompanhado presencialmente minha preparação e empenho para apresentar a minha defesa, pelo carinho e paciência, e pelo maior presente em minha vida que vocês puderam proporcionar: minha amada esposa Gabriella.

Ao Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro, que confiou em mim e me aceitou como aluno e orientado, devo dizer que foi uma experiência incrível e serei eternamente grato por todos os ensinamentos, pela parceria e pela paciência depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Caio Sampaio e Profa. Dra. Daniela Vanessa Moris de Oliveira, pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram esse estudo, assim como por transmitirem seus conhecimentos e experiências com maestria.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em especial ao curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, seus docentes e funcionários, assim como meus colegas de turma. Agradeço pelos conhecimentos, pelos bons conselhos, instruções e esclarecimentos.

À Maria do Socorro Alves, do Laboratório de Microbiologia da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), por toda a ajuda no desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro na forma de Bolsa de Iniciação Científica que possibilitou a execução do presente estudo (processo 2022/09156-2).

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001**.

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

RESUMO

Biofilme misto de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*: estabelecimento e validação de um modelo *in vitro* e comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos

Os objetivos do presente estudo foram estabelecer um modelo *in vitro* de biofilme misto de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*, validar este modelo de biofilme através da análise dose-resposta após tratamentos com amoxicilina e nistatina e comparar o efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos. Os biofilmes foram formados por 48 horas em placas de 96 poços e diferentes fatores de variação foram avaliados, incluindo o meio de cultura (*Brain Heart Infusion* (BHI) caldo ou saliva artificial (SA)), a película salivar humana (presente ou ausente) e a sequência de inoculação dos microrganismos. Os biofilmes resultantes foram analisados pela quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs), da biomassa total e da atividade metabólica. Para validar um dos modelos, o biofilme misto foi tratado com diferentes concentrações de amoxicilina e nistatina, e a biomassa e o metabolismo foram quantificados. Comparações do efeito antimicrobiano de amoxicilina de referência *versus* genérica e nistatina de referência *versus* genérica também foram realizadas, primeiramente pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para células planctônicas e, posteriormente, pela análise da biomassa e metabolismo dos biofilmes mistos. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ou por testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5%. O tipo de meio de cultura foi o único fator de variação que afetou a formação de biofilmes mistos. Biofilmes formados em SA mostraram biomassa significativamente maior do que aqueles formados em BHI caldo ($p < 0,001$). Uma tendência contrária foi observada para a atividade metabólica, visto que o metabolismo foi maior para biofilmes formados em BHI caldo ($p < 0,001$). O crescimento de *C. albicans* não foi afetado pelos diversos fatores, enquanto as contagens de UFCs de *S. pyogenes* foram significativamente menores para biofilmes formados em SA. Nos ensaios de validação, amoxicilina e nistatina mostraram efeitos redutores dose-dependentes. Ao se comparar fármacos de referência com genéricos, os dois produtos mostraram os mesmos valores de CIM (0,015 $\mu\text{g/mL}$ para *S. pyogenes* e 4 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*) e a mesma eficácia na redução da biomassa e metabolismo dos biofilmes mistos. Conclui-se que o modelo composto pela inoculação das duas espécies ao mesmo tempo, sem exposição prévia à película salivar e usando BHI caldo como meio de cultura foi validado e seria o de escolha para estudos futuros *in vitro* avaliando os efeitos de agentes antimicrobianos sobre biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans*. Por fim, os fármacos (amoxicilina e nistatina) de referência e genéricos exibiram efeitos similares sobre os patógenos estudados.

Palavras-chave: Amoxicilina, Biofilmes, *Candida albicans*, Candidíase, Medicamentos de Referência, Medicamentos Genéricos, Nistatina, *Streptococcus pyogenes*, Tonsilite.

ABSTRACT

Dual-species biofilm of *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*: assembly and validation of an *in vitro* model and comparison of the antibiofilm effect between reference and generic drugs

The objectives of the present study were to establish an *in vitro* model of dual-species biofilm of *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*, validate this biofilm model through dose-response analysis after treatments with amoxicillin and nystatin, and compare the antibiofilm effects of reference and generic drugs. Biofilms were formed for 48 hours in 96-well plates and different variation factors were evaluated, including the culture medium (Brain Heart Infusion (BHI) broth or artificial saliva (AS)), the human salivary pellicle (present or absent), and the inoculation sequence of microorganisms. The resulting biofilms were analyzed by quantifying colony-forming units (CFUs), total biomass and metabolic activity. To validate one of the models, the mixed biofilm was treated with different concentrations of amoxicillin and nystatin, and biomass and metabolism were quantified. Comparisons of the antimicrobial effect of reference *versus* generic amoxicillin, and reference *versus* generic nystatin were also performed, first by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) for planktonic cells and, subsequently, by analyzing the biomass and metabolism of the mixed biofilms. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test or by Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls' tests, with a significance level of 5%. The type of culture medium was the only variation factor that affected the formation of mixed biofilms. Biofilms formed in AS showed significantly higher biomass than those formed in BHI broth ($p < 0.001$). An opposite trend was observed for metabolic activity, as metabolism was greater for biofilms formed in BHI broth ($p < 0.001$). The growth of *C. albicans* was not affected by the different factors, while the CFU counts of *S. pyogenes* were significantly lower for biofilms formed in AS. In validation assays, amoxicillin and nystatin showed dose-dependent reducing effects. Comparing reference and generic drugs, the two products showed the same MIC values (0.015 $\mu\text{g/mL}$ for *S. pyogenes* and 4 $\mu\text{g/mL}$ for *C. albicans*) and the same effectiveness in reducing the biomass and metabolism of the mixed biofilms. In conclusion, the model involving the inoculation of the two species at the same time, without prior exposure to salivary pellicle and using BHI broth as culture medium was validated, and would be the choice for future *in vitro* studies assessing the effects of antimicrobial agents on dual-species biofilms of *S. pyogenes* and *C. albicans*. Finally, reference and generic drugs (amoxicillin and nystatin) exhibited similar effects on the pathogens studied.

Keywords: Amoxicillin, Biofilms, *Candida albicans*, Candidiasis, Generic Drugs, Nystatin, Reference Drugs, *Streptococcus pyogenes*, Tonsillitis.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	-	Análise de Variância
ATCC	-	American Type Culture Collection
BHI	-	Brain Heart Infusion
CA	-	<i>Candida albicans</i>
cGMP	-	current Good Manufacturing Practices
CIM	-	Concentração inibitória mínima
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	-	Solução salina tamponada com fosfato
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
SDA	-	Sabouraud Dextrose Agar
SP	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>
TSA	-	Trypticase Soy Agar
UFC	-	Unidade formadora de colônia
UV	-	Radiação ultravioleta
VC	-	Violeta crista

-

-

-

-

-

-

-

-

-

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Valores médios e desvios-padrões de biomassa total (A) e atividade metabólica (B) de biofilmes simples e mistos de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* formados nos diferentes modelos, usando BHI caldo ou saliva artificial (AS) como meio de cultura. SP: biofilme simples de *S. pyogenes*; CA: biofilme simples de *C. albicans*; SP-CA: biofilme misto com inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*; CA-SP: biofilme misto com inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*; SP+CA: biofilme misto com inoculação das duas espécies ao mesmo tempo. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de cultura e as sequências de inoculação dos microrganismos, respectivamente, enquanto os asteriscos representam semelhanças entre os grupos com e sem película salivar humana ($p < 0,05$; ANOVA a 3 critérios e teste post hoc de Tukey)..... 40
- Figura 2 - Valores médios e desvios-padrões do logaritmo de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pyogenes* (A) e *Candida albicans* (B) em biofilmes simples ou mistos formados nos diferentes modelos, usando BHI caldo ou saliva artificial (AS) como meio de cultura. SP: biofilme simples de *S. pyogenes*; CA: biofilme simples de *C. albicans*; SP-CA: biofilme misto com inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*; CA-SP: biofilme misto com inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*; SP+CA: biofilme misto com inoculação das duas espécies ao mesmo tempo. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de cultura e as sequências de inoculação dos microrganismos, respectivamente, enquanto os asteriscos representam semelhanças entre os grupos com e sem película salivar humana ($p < 0,05$; ANOVA a 3 critérios e teste post hoc de Tukey)..... 41
- Figura 3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme simples de *Streptococcus pyogenes* (A), do biofilme simples de *Candida albicans* (B) e do biofilme misto das duas espécies (C). Os biofilmes foram formados no fundo de poços de placas de 96 poços de poliestireno sem exposição prévia à saliva humana e usando BHI caldo como meio de cultura. Para a formação do biofilme misto, as duas espécies foram inoculadas no mesmo momento. Aumento das imagens: 5,00 Kx; barras: 10 μm 42
- Figura 4 - Resultados de biomassa total, representados por valores médios e desvios-padrões ou por medianas e quartis, de biofilmes mistos de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* tratados com amoxicilina de referência (B-AMO; A) ou genérica (G-AMO; B) nas concentrações de 1,5, 3 e 6 $\mu\text{g/mL}$. Os biofilmes também foram tratados com nistatina de referência (B-NYS; C) ou genérica (G-NYS; D) nas concentrações de 80, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Biofilmes mistos tratados com o meio de cultura puro, sem fármacos, foi o grupo controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA a 1 ou 2 critérios e teste post hoc de Tukey, ou Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls)..... 43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5 - Resultados de atividade metabólica, representados por valores médios e desvios-padrões ou por medianas e quartis, de biofilmes mistos de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* tratados com amoxicilina de referência (B-AMO; A) ou genérica (G-AMO; B) nas concentrações de 1,5, 3 e 6 µg/mL. Os biofilmes também foram tratados com nistatina de referência (B-NYS; C) ou genérica (G-NYS; D) nas concentrações de 80, 200 e 400 µg/mL. Biofilmes mistos tratados com o meio de cultura puro, sem fármacos, foi o grupo controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA a 1 ou 2 critérios e teste post hoc de Tukey, ou Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls)..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de amoxicilina e nistatina, de referência e genéricas, para <i>Streptococcus pyogenes</i> e <i>Candida albicans</i>	39
------------	---	----

SUMÁRIO

Artigo científico – Biofilme misto de <i>Streptococcus pyogenes</i> e <i>Candida albicans</i>: estabelecimento e validação de um modelo <i>in vitro</i> e comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos	14
Introdução	16
Materiais e Métodos	20
Resultados	26
Discussão	28
Referências	33
ANEXO - Normas de Submissão – Archives of Oral Biology.....	45

Biofilme misto de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*: estabelecimento e validação de um modelo *in vitro* e comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos

Guilherme dos Santos Gomes Alves¹, Amanda Munarolo Piacenza de Oliveira², Heitor Ceolin Araujo³, Maria do Socorro Alves⁴, Caio Sampaio³, Juliano Pelim Pessan³, Douglas Roberto Monteiro¹

¹Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Faculdade de Odontologia - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, Araçatuba, SP, Brasil.

⁴Mestrado em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Autor correspondente: Prof. Douglas Roberto Monteiro

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária,

Presidente Prudente - SP, Brasil

CEP: 19050-920

Email: douglas@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico ao qual será submetido: Archives of Oral Biology, Fator de impacto: 3.0, Qualis CAPES A1.

Resumo

Este estudo objetivou estabelecer e validar um modelo de biofilme misto de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*, e comparar o efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos. Os biofilmes foram formados sob diferentes fatores, incluindo meio de cultura (Brain Heart Infusion (BHI) caldo ou saliva artificial (SA)), película salivar humana e sequência de inoculação dos microrganismos. Para validação, o biofilme foi tratado com amoxicilina ou nistatina, e comparações entre fármacos de referência e genéricos também foram realizadas. Os biofilmes resultantes foram analisados por quantificação das células cultiváveis, da biomassa total e da atividade metabólica. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ou por testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$). O meio de cultura foi o único fator que afetou a formação dos biofilmes. Biofilmes formados em SA mostraram maior biomassa do que aqueles formados em BHI ($p<0,001$), e o metabolismo foi maior para biofilmes formados em BHI ($p<0,001$). O crescimento de *C. albicans* não foi afetado pelos diversos fatores, enquanto as contagens de colônias de *S. pyogenes* foram menores quando SA foi usada. Amoxicilina e nistatina apresentaram efeitos redutores dose-dependentes, e os produtos de referência e genéricos exibiram eficácia similar na redução da biomassa e metabolismo dos biofilmes. Conclui-se que o modelo composto pela inoculação das duas espécies ao mesmo tempo, sem exposição prévia à película salivar e usando BHI caldo como meio de cultura foi validado e seria o de escolha para estudos *in vitro* avaliando biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans*.

Palavras-chave: Amoxicilina, Biofilmes, *Candida albicans*, Candidíase, Medicamentos de Referência, Medicamentos Genéricos, Nistatina, *Streptococcus pyogenes*, Tonsilite.

Introdução

A amigdalite é o quadro inflamatório que acomete o tecido linfoide das tonsilas palatinas, especificamente localizadas entre os pilares anterior (arco palatoglosso) e posterior (arco palatofaríngeo), sendo constituído por tecido conjuntivo e linfócitos do tipo B¹. As amígdalas, ou tonsilas palatinas, juntamente com as tonsilas faríngeas, tonsilas linguais, tecido linfoide peritubário e granulações parafaríngeas fazem parte do anel linfático de Waldeyer, o qual é responsável pelo primeiro contato com patógenos provenientes do ar inalado ou alimentos ingeridos contaminados¹.

O tecido linfoide do anel linfático de Waldeyer apresenta sua maior atividade imunológica na infância, entre 4 e 10 anos de vida, diminuindo com o advento da puberdade². Dessa forma, casos de amigdalite costumam ser mais frequentes em crianças, sendo responsável por cerca de 6% das consultas de cuidados primários³. Embora a causa mais comum de quadros de amigdalite seja viral, 30% dos casos têm etiologia bacteriana. A amigdalite estreptocócica, ao contrário da viral, é rara antes dos 3 anos, e mais comum entre 5 e 15 anos. Seus sintomas apresentam início súbito com febre alta, odinofagia, cefaleia e sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e dores abdominais².

Informações sobre a composição do microbioma tonsilar são escassas, porém fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota têm sido identificados⁴, além de Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, sendo que os gêneros bacterianos mais comumente isolados são *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Gemella*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Leptotrichia*⁵. Dentre os agentes infecciosos bacterianos responsáveis pelos quadros de amigdalite, é comum infecção por *Streptococcus* beta-hemolíticos do grupo A, principalmente *Streptococcus pyogenes*. Infecções causadas por *Streptococcus* dos grupos C e G, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Francisella tularensis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* e *Corynebacterium diphtheriae*, apesar de ocorrerem, são menos frequentes^{5,6}.

Um estudo realizado por Enin *et al.*⁷, através de material coletado da garganta de 668 pacientes com amigdalite crônica, demonstrou que metade apresentou infecção por *S. pyogenes* e 24,5% por *Mycoplasma pneumoniae*. Ainda, para crianças com indicação de tonsilectomia (seja por amigdalite aguda recorrente ou hipertrofia tonsilar), *S. pyogenes* foi isolado com maior frequência (47%) em crianças com tonsilite recorrente, enquanto *Streptococcus* beta-hemolíticos não A, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* predominaram em crianças com hipertrofia tonsilar⁸. Como não existem vacinas contra *Streptococcus* do grupo A,

a antibioticoterapia é essencial para o tratamento, sendo eficaz quando realizada de forma correta. Apesar da menor incidência de resistência microbiana associada a *S. pyogenes*, esse patógeno ainda é um dos principais responsáveis por óbitos em infecções no mundo⁹.

De fato, *S. pyogenes* causa infecções do trato respiratório superior, colonizando a nasofaringe, e pode se disseminar para outros locais, estando presente em até 24% da nasofaringe de crianças saudáveis⁹. Um pré-requisito para o desenvolvimento de tonsilite aguda é a adesão dessa bactéria ao epitélio tonsilar¹⁰, a qual é mediada por pili¹¹. Dentre os principais fatores de virulência dessa bactéria Gram-positiva associados aos quadros de infecção estão a alta atividade hemolítica, a capacidade de sintetizar enzimas e exotoxinas¹⁰ e a habilidade de formar biofilmes^{12,13}.

As tonsilas também podem ser colonizadas por fungos do gênero *Candida*. Embora essas leveduras constituam uma menor parte do microbioma tonsilar e oral, elas podem ser isoladas como comensais em indivíduos saudáveis, sendo comumente identificadas sobre a língua, mucosas orais e tonsilas^{14,15}. Em pacientes imunocomprometidos, indivíduos idosos, usuários de próteses orais removíveis e crianças com sistema imune imaturo, é comum o aparecimento de candidoses¹⁶, as quais podem acometer os tecidos orais e tonsilares. Esta patologia caracteriza-se pela presença de mucosas inflamadas, sensação de queimação oral, desconforto, mau hálito e odinofagia¹⁷. Dentro desse contexto, culturas positivas para *Candida albicans* a partir de tonsilas palatinas e faríngeas têm sido reportadas para pacientes com tonsilite crônica ou infecções respiratórias recorrentes¹⁸. Ainda, a taxa de incidência de adenoidite fúngica em crianças atinge valor próximo a 16%, enquanto para crianças com tonsilite crônica, a incidência de tonsilomicoses chega a 21,5%, e *C. albicans* é o fungo mais frequentemente detectado nessa patologia¹⁹. *Candida albicans* produz enzimas hidrolíticas que colaboram para a invasão dos tecidos hospedeiros através da digestão ou destruição das membranas celulares²⁰. Estas enzimas também podem atacar as células e moléculas do sistema imune do hospedeiro²⁰. Além disso, a capacidade de formação de biofilmes sobre superfícies bióticas e abióticas é considerada um dos principais fatores de virulência de *C. albicans*^{21,22}.

Os biofilmes são consórcios microbianos complexos, heterogêneos, altamente organizados e protegidos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos²³. As características fenotípicas de comunidades microbianas que crescem como biofilmes são diferentes dos seus homólogos no estado planctônico, apresentando vantagens como maior captação de nutrientes, proteção contra agressões externas (radiação UV, fagocitose e desidratação), além de tolerância a antimicrobianos e às defesas do hospedeiro²⁴. A formação de biofilmes é um desafio crescente na área biomédica, responsável por cerca de

80% das infecções microbianas no corpo humano, visto que em situações de disbiose pode levar a quadros infecciosos crônicos dos tecidos, como os casos de tonsilites bacterianas, fúngicas ou bacterianas/fúngicas²⁵. A sua erradicação ou controle requer o uso de terapias antibióticas agressivas, desbridamento cirúrgico ou remoção do tecido infectado²⁵.

No corpo humano, incluindo os tecidos tonsilares, bactérias e fungos interagem e coexistem independentemente se o hospedeiro está no estado de saúde ou doença²⁶. As interações entre microrganismos em biofilmes mistos podem ser classificadas como sinérgicas (quando uma espécie beneficia a outra), indiferentes ou antagônicas, sendo a última caracterizada pela inibição ou morte de um microrganismo por produtos microbianos de outros microrganismos²⁷. As moléculas de comunicação celular conhecidas como *Quorum Sensing* também participam do controle da formação de biofilmes mistos, coordenando a densidade celular e taxas de crescimento dos diferentes microrganismos²⁸. Nesse cenário, a formação de biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans* tem sido muito pouco explorada, apesar de sua relevância clínica na etiopatogênese das tonsilites. Considerando o cenário acima, um estudo prévio demonstrou que a presença de *S. pyogenes* reduziu o desenvolvimento de *C. albicans* em biofilmes mistos das duas espécies formados em placas de 96 poços, e esse resultado pode estar associado à supressão da transformação de leveduras em hifas em *C. albicans*²⁹. Apesar desse resultado prévio interessante, até o presente momento, não existe um trabalho publicado estabelecendo um modelo de biofilme misto composto por *S. pyogenes* e *C. albicans* para estudos pré-clínicos *in vitro*. Assim, é plausível que a seleção do modelo usado por Park *et al.*²⁹ pode ter refletido a preferência dos investigadores à época do estudo. Por outro lado, o estabelecimento de um modelo de biofilme deve levar em conta o grau de controle que ele fornece aos aspectos fisiológicos dos microrganismos, o realismo com que ele mimetiza algumas condições *in vivo* e a sua facilidade de reprodução³⁰.

Por outro lado, a antibioticoterapia é primordial para o tratamento de diversas infecções, incluindo as tonsilites, demonstrando eficácia e resolutividade quando realizada de forma correta³¹. Dentre os antibióticos usados no tratamento das tonsilites, os betalactâmicos são os mais utilizados, com destaque para a amoxicilina, a qual é uma aminopenicilina semissintética com atividade bactericida sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. O baixo custo e alto perfil de segurança contribuem para o seu uso em diversas infecções, como aquelas do trato respiratório, do ouvido, da pele e do trato urinário³².

Quando se considera a demanda, as indústrias têm instigado a classe médica a prescrever medicamentos genéricos. Na Indonésia, por exemplo, o Ministério da Saúde defende que os médicos, especialmente nos postos de saúde do governo, prescrevam medicamentos genéricos,

sendo a amoxicilina um deles³². O controle é realizado de forma rigorosa e criteriosa por meio de regulamentações designadas aos fabricantes de medicamentos, as quais são conhecidas por cGMP (*current Good Manufacturing Practices*), imposta pela Agência Nacional de Controle de Medicamentos e Alimentos³². Este regulamento é aplicado tanto para medicamentos genéricos quanto para medicamentos de referência, e tem como exigência os testes intensivos *in vitro* e *in vivo* dos produtos antes de serem disponibilizados ao público. Com isso, os apontamentos de que genéricos são de qualidade inferior devem ser analisados com cautela, uma vez que mesmo com o custo mais baixo, a qualidade deveria ser equivalente àquela dos medicamentos de referência³².

A fim de avaliar a equivalência terapêutica de medicamentos genéricos comparados aos de referência, utiliza-se de estudos randomizados que respeitem os padrões de bioequivalência, os quais exigem que os intervalos de confiança de 90% das médias de grupo das medidas farmacocinéticas de um medicamento genérico e de referência se sobreponham em $\pm 20\%$ ³³⁻³⁵. Além disso, estudos de equivalência farmacocinética são realizados para cada genérico e refletem várias respostas clínicas, uma vez que as alterações farmacocinéticas se relacionam com idade, sexo, etnia, fator genético e índice de massa corporal³³⁻³⁶. Nos países em desenvolvimento, as evidências científicas não são o marco oficial para o incentivo à prescrição de genéricos, e sim a disponibilidade destes no mercado. Porém, essa substituição repentina, sem analisar a eficácia das preparações, pode provocar o aumento do risco de resistência, principalmente quando se trata de antibióticos³⁷.

O fato é que a maioria dos países se baseia no alto custo dos medicamentos como uma das principais barreiras, e quando somado ao aumento dos custos dos serviços de saúde tornam-se os maiores incentivos à prescrição de genéricos, uma vez que estes são 2,6 vezes mais baratos que os medicamentos de referência^{38,39}. Assim, para diminuir os gastos com os fármacos, mas buscando sustentar uma substituição segura, a saída encontrada pelos países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América, foi instituir uma política de substituição segura para medicamentos genéricos, definida por características da *Food & Drug Administration*. Segundo esta agência, os genéricos deverão ter as seguintes características em relação aos fármacos de referência: o mesmo princípio ativo; semelhança de força, forma e via de administração; mesmas indicações; mesmas condições de bioequivalência; cumprir o requisito do lote em termos de identidade, pureza e qualidade; ser fabricado de acordo com as normas de Boa Prática de Fabricação; ser comparado ao medicamento de referência de acordo com as normas de Boas Práticas de Laboratório³⁷.

Por sua vez, a nistatina é um antifúngico da classe dos polienos indicado para o

tratamento de candidíases, quando esta patologia afeta a cavidade bucal, tecidos tonsilares e trato digestivo superior. Apesar de ser um antifúngico tópico bastante usado em casos de candidíase, faltam trabalhos na literatura comparando a eficácia entre seus produtos de referência e genéricos. Quando se trata de antifúngicos da classe dos polienos, contudo, estudos prévios têm explorado a comparação entre anfotericina B de referência e genérica^{40,41}, mostrando que a formulação genérica de anfotericina B é comparável à de referência⁴⁰.

Considerando todo o contexto reportado acima, verifica-se que ainda existem lacunas na literatura em relação ao estabelecimento de um modelo *in vitro* adequado para biofilme misto de *S. pyogenes* e *C. albicans* e também no que diz respeito aos efeitos de fármacos de referência e genéricos sobre esse biofilme misto. Portanto, os objetivos desse estudo foram (1) estabelecer um modelo *in vitro* de biofilme misto de *S. pyogenes* e *C. albicans*, determinando as condições ideais para a sua formação, (2) validar o modelo de biofilme testado através da análise dose-resposta frente a tratamentos com amoxicilina e nistatina e (3) comparar o efeito antibiofilme entre fármacos (amoxicilina e nistatina) de referência e genéricos.

Materiais e métodos

Estabelecimento de um modelo *in vitro* de biofilme misto de *S. pyogenes* e *C. albicans*

Meios de cultura para formação de biofilmes

Os biofilmes mistos foram formados em dois diferentes meios de cultura: *Brain Heart Infusion* caldo (BHI; Difco, Le Pont de Claix, França) ou saliva artificial. A saliva artificial foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Lamfon *et al.*⁴², com a seguinte composição para 1 L de água deionizada: 2 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich), 5 g de peptona bacteriológica (Sigma-Aldrich), 2 g de glicose (Sigma-Aldrich), 1 g de mucina (Sigma-Aldrich), 0,35 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,2 g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich). O pH da saliva foi ajustado com NaOH para 6,8.

Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Para este estudo foram utilizadas as seguintes cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC): *S. pyogenes* ATCC 19615 e *C. albicans* ATCC 10231. Culturas de *S. pyogenes* mantidas a -80 °C foram semeadas em *Trypticase Soy Agar* (TSA; Difco) com 5% de sangue fresco de carneiro e incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Para *C. albicans*, as culturas foram semeadas em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA; Difco) por 24 horas a 37 °C.

Após o crescimento em meio agar sólido, uma alçada da cepa bacteriana foi suspensa em 10 mL de BHI caldo e incubada *overnight* em 5% de CO₂ a 37 °C. Por sua vez, colônias de *C. albicans* foram suspensas em 10 mL de *Sabouraud Dextrose* caldo (Difco) e incubadas *overnight* a 37 °C. Após o período de incubação, uma suspensão microbiana de *S. pyogenes* foi obtida conforme a curva de crescimento do microrganismo (DO_{640 nm} = 0,25) e, posteriormente, esta suspensão foi diluída em saliva artificial ou BHI caldo para atingir a concentração final de 1 x 10⁷ células/mL (concentração usada para formar biofilmes)^{43,44}. As células fúngicas foram recuperadas por centrifugação (8000 rpm, 5 minutos), lavadas duas vezes com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7) e ajustadas para 10⁷ células/mL nos mesmos meios de cultura, porém com o auxílio de uma Câmara de Neubauer e um microscópio óptico⁴⁵.

Coleta de saliva humana

Para a coleta das amostras de saliva, este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade do Oeste Paulista (CAAE: 63738222.5.0000.5515). A saliva humana foi doada por três voluntários adultos saudáveis e coletada em tubos de polipropileno durante a estimulação mastigatória com filme flexível⁴⁶ (Parafilm® M; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O *pool* de saliva dos três doadores foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana de 0,22 µm⁴⁶ (Corning Inc., Corning, EUA). Essa amostra de saliva foi usada para condicionar o fundo dos poços de placas de 96 poços (Costar, Tewksbury, EUA), permitindo a formação de uma película salivar previamente à formação de biofilmes.

Formação de biofilmes mistos

Os fundos dos poços de placas de 96 poços de poliestireno foram usados como superfícies para o desenvolvimento dos biofilmes. Para a formação de biofilmes mistos, diferentes fatores de variação foram avaliados, incluindo o meio de cultura (BHI caldo ou saliva artificial), a película salivar humana (presente ou ausente) e a sequência de inoculação dos microrganismos. Desta forma, 12 diferentes modelos foram testados, como detalhado abaixo:

- 1) Biofilmes formados no fundo de poços previamente expostos à saliva humana e com a inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*, usando BHI caldo como meio de cultura.
- 2) Biofilmes formados no fundo de poços previamente expostos à saliva humana e com a inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*, usando BHI caldo como meio de cultura.

- 3) Biofilmes formados no fundo de poços previamente expostos à saliva humana e com a inoculação das duas espécies no mesmo momento, usando BHI caldo como meio de cultura.
- 4) Biofilmes formados no fundo de poços não expostos à saliva humana e com a inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*, usando BHI caldo como meio de cultura.
- 5) Biofilmes formados no fundo de poços não expostos à saliva humana e com a inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*, usando BHI caldo como meio de cultura.
- 6) Biofilmes formados no fundo de poços não expostos à saliva humana e com a inoculação das duas espécies no mesmo momento, usando BHI caldo como meio de cultura.
- 7) Biofilmes formados no fundo de poços previamente expostos à saliva humana e com a inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*, usando saliva artificial como meio de cultura.
- 8) Biofilmes formados no fundo de poços previamente expostos à saliva humana e com a inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*, usando saliva artificial como meio de cultura.
- 9) Biofilmes formados no fundo de poços previamente expostos à saliva humana e com a inoculação das duas espécies no mesmo momento, usando saliva artificial como meio de cultura.
- 10) Biofilmes formados no fundo de poços não expostos à saliva humana e com a inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*, usando saliva artificial como meio de cultura.
- 11) Biofilmes formados no fundo de poços não expostos à saliva humana e com a inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*, usando saliva artificial como meio de cultura.
- 12) Biofilmes formados no fundo de poços não expostos à saliva humana e com a inoculação das duas espécies no mesmo momento, usando saliva artificial como meio de cultura.

Para os modelos com formação de película adquirida previamente à inoculação dos microrganismos, o *pool* de saliva humana estimulada (200 µL) foi adicionado a cada poço de uma placa de 96 poços e as placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C⁴⁷. Após este período, a saliva humana foi removida e 200 µL do inóculo microbiano foram pipetados no interior dos

poços.

Em relação ao inóculo microbiano, três modelos foram testados. No primeiro, um inóculo inicial (200 µL) contendo *S. pyogenes* na concentração de 10^7 células/mL (em BHI caldo ou saliva artificial) foi pipetado nos poços de placas de 96 poços. Após incubação estática por 8 horas (fase de adesão celular)⁴⁸ em microaerofilia (5% de CO₂; 37 °C), o inóculo de *S. pyogenes* foi removido dos poços e adicionado 200 µL de um novo inóculo microbiano composto por *C. albicans* na concentração de 10^7 células/mL (em BHI caldo ou saliva artificial), e as placas foram incubadas estaticamente por mais 16 horas em microaerofilia a 37 °C. Após 24 horas de formação de biofilmes (8 + 16 horas), o meio de cultura foi renovado através da remoção do inóculo microbiano e inserção de 200 µL de meio de cultura fresco (BHI caldo ou saliva artificial), e as placas foram incubadas por mais 24 horas. No total, os biofilmes foram formados por 48 horas. Esse modelo foi denominado SP-CA. O segundo modelo foi realizado como descrito para o primeiro, com a diferença de que *C. albicans* foi inoculada primeiro, seguido da inoculação de *S. pyogenes* depois das primeiras 8 horas de adesão celular de *Candida*. Esse modelo foi denominado CA-SP. No último modelo, foi preparado um inóculo microbiano misto (em BHI caldo ou saliva artificial) contendo as duas espécies acima mencionadas, cada uma na concentração final de 10^7 células/mL, e as placas foram incubadas por 8 horas em 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período, o inóculo foi descartado e 200 µL de meio de cultura fresco (BHI caldo ou saliva artificial) foram pipetados no interior de cada poço, e as placas incubadas por mais 16 horas em microaerofilia a 37 °C. Neste caso, a renovação do meio de cultura também foi realizada após as primeiras 24 horas de formação de biofilme e os biofilmes totais foram formados por 48 horas. Esse modelo foi denominado SP+CA. Biofilmes simples de *S. pyogenes* (SP) e *C. albicans* (CA) desenvolvidos durante 48 horas no fundo de poços de placas de 96 poços (expostos ou não à saliva humana) e usando BHI caldo ou saliva artificial como meios de cultura foram testados como controles.

Quantificação da biomassa total, da atividade metabólica e das células cultiváveis dos biofilmes

A produção de biomassa total pelos biofilmes foi analisada pela coloração com violeta cristal (VC)⁴⁵. Após 2 dias de formação de biofilmes, os mesmos foram lavados três vezes com PBS e 200 µL de metanol (Sigma-Aldrich) a 99% foram pipetados em cada poço. Após um período de fixação dos biofilmes por 15 minutos e secagem em temperatura ambiente, 200 µL/poço de solução de VC (Sigma- Adrich) a 1% foram pipetados e as placas, incubadas por 5 min. Na sequência, os excessos de VC dos biofilmes foram removidos por lavagem com água

deionizada. Um volume de 200 μL de ácido acético (Sigma-Aldrich) a 33% foi pipetado em cada poço com a finalidade de liberar o corante dos biofilmes. Finalmente, a absorbância da solução obtida em cada poço foi lida a 570 nm. Os dados foram exibidos como absorbância/ cm^2 . Ainda, os valores de branco foram obtidos a partir de poços expostos aos meios de cultura puros, sem microrganismos.

A atividade metabólica foi avaliada através do ensaio de redução do XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide; Sigma-Aldrich)⁴⁹. Após 48 horas de formação dos biofilmes, os mesmos foram lavados com PBS e 200 μL de uma solução de 150 mg XTT/L e 10 mg de metassulfato de fenazina/L foram pipetados em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C no escuro, com agitação de 120 rpm. Após 3 horas, 200 μL do sobrenadante foram transferidos para novos poços de placas de microtitulação de 96 poços e a absorbância, lida a 490 nm. Os dados também foram expressos como absorbância/ cm^2 , e os brancos foram processados como detalhado no ensaio de quantificação da biomassa total.

Para a quantificação das células cultiváveis, os biofilmes resultantes foram lavados com PBS para remoção das células fracamente aderidas, raspados dos poços com PBS e transferidos para tubos estéreis de 5 mL⁵⁰. Os tubos foram colocados em cuba ultrassônica por 2 min (55W; Ultronique, São Paulo, Brazil) e agitados em vórtex por 1 min⁵⁰. Posteriormente, as suspensões microbianas obtidas foram diluídas seriadamente em PBS e plaqueadas nos seguintes meios de cultura: a) TSA suplementado com 5% de sangue fresco de carneiro e anfotericina B (Sigma-Aldrich; 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para quantificação de *S. pyogenes* e b) CHROMagar *Candida* (Difco) para a quantificação de *C. albicans*. As placas de TSA foram incubadas em condições de microaerofilia (5% de CO_2), enquanto as placas de CHROMagar *Candida* foram incubadas aerobicamente. A contagem do número de unidades formadoras de colônias (Log_{10} UFC/mL) foi realizada após 48-72 horas de incubação a 37 °C.

Análise da estrutura dos biofilmes por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O modelo de biofilme misto formado no fundo do poço de uma placa de 24 poços não exposto à saliva humana, com a inoculação das duas espécies no mesmo momento e usando BHI caldo como meio de cultura foi selecionado para a análise de MEV. A escolha desse modelo se deve aos seus melhores resultados quantitativos e à sua praticidade metodológica, como detalhado nas seções de Resultados e Discussão. Assim, após o período de formação, o biofilme foi lavado com PBS, desidratado, fixado com concentrações sequenciais de etanol (etanol 70 % por 10 minutos, etanol 95 % por 10 minutos e etanol 100 % por 20 minutos) e

seco ao ar por 20 minutos⁵¹. O fundo do poço foi, então, cortado com uma lâmina de bisturi aquecida. A amostra gerada foi montada em *stub* de alumínio, revestida com ouro e observada em um microscópio eletrônico de varredura (S-360, Leo, Cambridge, EUA). Biofilmes simples de *S. pyogenes* e *C. albicans* foram incluídos na análise de MEV.

Validação do modelo de biofilme testado e comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos

Amoxicilina e nistatina

No presente estudo, Novocilin 400 mg/5 mL (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., São Paulo, SP, Brasil) e Amoxicilina tri-hidratada 400 mg/5 mL (Eurofarma Laboratórios S.A., Itapevi, SP, Brasil) foram os medicamentos de referência e genérico testados, respectivamente. Para nistatina, Canditrat suspensão oral 100.000 UI/mL (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Anápolis, GO, Brasil) e Nistatina suspensão oral 100.000 UI/mL (Prati Donaduzzi, Toledo, PR, Brasil) foram os medicamentos de referência e genérico testados, respectivamente.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs para *S. pyogenes* ATCC 19615 e *C. albicans* ATCC 10231 no estado planctônico foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo, de acordo com os documentos M27-A3⁵² e M07-A9⁵³ do *Clinical Laboratory Standards Institute*, respectivamente para *C. albicans* e *S. pyogenes*, com modificações. As suspensões comerciais de amoxicilina e nistatina, de referência e genéricas, foram diluídas em água deionizada em progressão geométrica, de 2 a 1024 vezes. Cada concentração obtida previamente foi diluída (1:5) nos meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich) e BHI caldo, respectivamente para *C. albicans* e *S. pyogenes*. Inóculos de culturas de 24 horas dos microrganismos semeados em SDA e TSA foram ajustados para uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland em solução salina (0,85% NaCl), correspondendo a concentrações de 0,5-2,5 x 10³ UFCs/mL e 5-10 x 10⁵ UFCs/mL, respectivamente para *C. albicans* e *S. pyogenes*. As suspensões de cada cepa foram diluídas (1:5) em solução salina e, posteriormente, diluídas (1:20) em RPMI 1640 (para *C. albicans*) ou BHI caldo (para *S. pyogenes*). Cada suspensão de microrganismo (100 µL) foi adicionada aos poços de placas de microtitulação de 96 poços (Costar, Tewksbury, EUA) contendo 100 µL de cada concentração específica dos diferentes fármacos. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C e, após

24 horas, as CIMs foram determinadas visualmente como sendo as menores concentrações capazes de inibir o crescimento dos microrganismos. Ainda, controles sem fármacos também foram incluídos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes.

Formação de biofilme e tratamento com fármacos de referência e genéricos

Para este ensaio, o modelo de biofilme misto formado no fundo do poço de uma placa de 96 poços não exposto à saliva humana, com a inoculação das duas espécies no mesmo momento e usando BHI caldo como meio de cultura foi selecionado. Esse biofilme misto também foi formado por 48 horas, como detalhado previamente. Após 48 horas de formação, os biofilmes foram tratados durante 24 horas com amoxicilina (de referência e genérica) ou nistatina (de referência e genérica), ambas diluídas no meio de cultura para se obter concentrações finais de 100, 200 e 400 vezes a CIM (para amoxicilina) e de 20, 50 e 100 vezes a CIM (para nistatina). Como controle negativo, o biofilme pré-formado (48 horas) foi exposto por 24 horas ao meio de cultura puro, sem qualquer tipo de fármaco. Posteriormente, foram realizadas as análises de quantificação da biomassa total e da atividade metabólica, como detalhado previamente. Assim, foi possível verificar um possível efeito dose-resposta dos diferentes fármacos, permitindo ou não a validação do modelo de biofilme, bem como comparar os efeitos antibiofilme de fármacos de referência *versus* genéricos.

Análise estatística

Para todos os testes microbiológicos foram realizados pelo menos 3 ensaios independentes, cada um em triplicata ($n \geq 3 \times 3 \geq 9$). Na análise do estabelecimento de um novo modelo *in vitro* de biofilme misto, os fatores de variação investigados foram o tipo de meio de cultura (BHI caldo ou saliva artificial), a película salivar humana (presente ou ausente) e a sequência de inoculação dos microrganismos (SP-CA, CA-SP ou SP+CA). Os dados de biomassa total, atividade metabólica e células cultiváveis de *S. pyogenes* passaram nos testes de normalidade da distribuição amostral (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias, enquanto os resultados de células cultiváveis de *C. albicans* não passaram no teste de normalidade. Todos os resultados foram analisados por ANOVA a 3 critérios e teste *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

Na análise de validação do modelo de biofilme misto, os resultados de biomassa para nistatina de referência, além dos dados de metabolismo para nistatina (referência e genérica) e amoxicilina de referência passaram nos testes de normalidade da distribuição amostral (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias, e foram analisados por ANOVA a 1 critério

e teste *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%. Os dados de biomassa para amoxicilina (referência e genérica) e nistatina genérica, além dos dados de metabolismo para amoxicilina genérica não passaram no teste de normalidade e foram analisados por Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

Na análise de comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos, os fatores de variação investigados foram o tipo de fármaco (referência ou genérico) e suas concentrações. Os dados de biomassa e metabolismo para nistatina passaram nos testes de normalidade da distribuição amostral (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias, enquanto os resultados de biomassa e metabolismo para amoxicilina não passaram no teste de normalidade. Todos os resultados foram analisados por ANOVA a 2 critérios e teste *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%. Para todas as análises de dados foi empregado o *software* SigmaPlot (version 12.0; Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Resultados

Estabelecimento de um modelo *in vitro* de biofilme misto de *S. pyogenes* e *C. albicans*

Quantificação da biomassa total e da atividade metabólica dos biofilmes

A película salivar humana e a sequência de inoculação dos microrganismos não afetaram significativamente a produção de biomassa total e a atividade metabólica dos biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. pyogenes* (Fig. 1A e 1B). O tipo de meio de cultura, contudo, afetou os parâmetros de biofilme analisados. Quando os biofilmes mistos e simples de *C. albicans* foram formados em saliva artificial, a biomassa total aumentou em 25,7 a 41,9% em comparação aos biofilmes formados em BHI caldo ($p < 0,001$; Fig. 1A). Uma tendência contrária foi observada para biofilmes simples de *S. pyogenes*, visto que a biomassa total aumentou na ordem de 51,4 a 58,8% quando BHI caldo foi usado como meio de cultura ($p < 0,001$; Fig. 1A). Para a atividade metabólica, o metabolismo aumentou em 29,5 a 33,3% quando os biofilmes simples e mistos foram formados em BHI caldo em comparação àqueles formados em saliva artificial ($p < 0,001$; Fig. 1B). Finalmente, tanto a biomassa total quanto o metabolismo dos biofilmes mistos atingiram valores quantitativos estatisticamente semelhantes e superiores àqueles encontrados para biofilmes simples de *C. albicans* ($p > 0,05$) e *S. pyogenes* ($p < 0,001$), respectivamente (Fig. 1A e B).

Quantificação das células cultiváveis dos biofilmes

Para *S. pyogenes*, os valores de UFCs foram significativamente maiores para biofilmes simples e mistos formados em BHI caldo comparados com saliva artificial, e os aumentos gerados nos valores de UFCs variaram de 1,24 a 2,58- \log_{10} ($p < 0,001$; Fig. 2A). Analisando a sequência de inoculação dos microrganismos, o número de UFCs de *S. pyogenes* foi significativamente maior para o grupo SP-CA em comparação ao grupo CA-SP, quando os biofilmes foram formados em saliva artificial sem exposição prévia à saliva humana (Fig. 2A). De uma forma geral, os valores de UFCs de *S. pyogenes* em biofilmes mistos foram significativamente maiores do que aqueles encontrados para biofilmes simples (Fig. 2A).

Para UFCs de *C. albicans*, o tipo de meio de cultura influenciou a formação de biofilmes mistos. Os modelos SP-CA e SP+CA exibiram valores maiores de UFCs para biofilmes formados em saliva artificial em comparação com BHI caldo ($p < 0,001$; Fig. 2B). A sequência de inoculação dos microrganismos não afetou significativamente os valores de UFCs de *C. albicans*.

A película salivar humana não exerceu influência significativa nos valores de UFCs de *S. pyogenes* e *C. albicans* (Fig. 2).

Análise da estrutura dos biofilmes por MEV

A estrutura do biofilme simples de *S. pyogenes* foi composta por aglomerados de cocos, em multicamadas, cobrindo parcialmente a superfície (Fig. 3A), enquanto o biofilme simples de *C. albicans* revelou uma multicamada de leveduras e hifas (Fig. 3B). Por sua vez, a estrutura do biofilme misto mostrou uma rede compacta de cocos, leveduras e hifas interconectadas, cobrindo totalmente a superfície (Fig. 3C). Também foi possível observar leveduras e hifas de *Candida* envoltas por células bacterianas (Fig. 3C).

Validação do modelo de biofilme testado e comparação do efeito antibiofilme entre fármacos de referência e genéricos

Concentração inibitória mínima

Os valores de CIM de amoxicilina e nistatina para *S. pyogenes* e *C. albicans* foram 0,015 e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Não houveram diferenças nos valores de CIM ao se comparar os fármacos de referência com os genéricos (Tabela 1).

Quantificação da biomassa total dos biofilmes mistos

Amoxicilina e nistatina mostraram efeitos dose-dependentes sobre a biomassa total dos biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans*, com as maiores concentrações dos fármacos atingindo as maiores reduções (Fig. 4). Amoxicilina de referência e genérica nas concentrações de 3 e 6 µg/mL levaram a reduções significativas na biomassa total variando de 12,6 a 25,2% ($p < 0,001$), em comparação ao grupo controle (Fig. 4A e B). Para nistatina, os fármacos de referência e genérico nas concentrações de 80, 200 e 400 µg/mL levaram a reduções de 9,5 ($p < 0,001$), 31,5 ($p < 0,001$) e 41% ($p < 0,001$) comparados ao controle, respectivamente (Fig. 4C e D). As análises de variância a dois critérios para comparar amoxicilina de referência com genérica e nistatina de referência com genérica não mostraram diferenças significativas dentro de cada concentração específica dos fármacos.

Quantificação da atividade metabólica dos biofilmes mistos

Todas as concentrações testadas de amoxicilina e nistatina geraram reduções significativas no metabolismo dos biofilmes mistos, com efeitos dose-dependentes (Fig. 5). Amoxicilina de referência e genérica nas concentrações de 1,5, 3 e 6 µg/mL promoveram reduções significativas no metabolismo de 4,2 ($p < 0,001$), 9,6 ($p < 0,001$) e 17,5% ($p < 0,001$) comparadas ao grupo controle, respectivamente (Fig. 5A e B). Para nistatina, os fármacos de referência e genérico nas concentrações de 80, 200 e 400 µg/mL levaram a reduções de 10,8 ($p < 0,001$), 25,9 ($p < 0,001$) e 43,4% ($p < 0,001$) comparados ao controle, respectivamente (Fig. 5C e D). As análises de variância a dois critérios para comparar amoxicilina de referência com genérica e nistatina de referência com genérica não mostraram diferenças significativas dentro de cada concentração específica dos fármacos.

Discussão

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes condições de crescimento na formação de biofilme misto de *S. pyogenes* e *C. albicans*, visando ao estabelecimento de um modelo *in vitro* adequado para esse biofilme. O primeiro fator de variação avaliado foi a influência da película de saliva humana, considerando que, clinicamente, as tonsilas palatinas e linguais estão constantemente revestidas por saliva. Além do papel na digestão de alimentos e lubrificação dos tecidos bucais e tonsilares, a saliva atua na formação de uma camada glicoproteica chamada película salivar, a qual é formada pela adsorção de componentes salivares em superfícies como dentes, biomateriais e tecidos mucosos⁵⁴. Os componentes salivares ligam-se a diferentes superfícies por interações não covalentes, como

ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e de Van der Waals⁵⁵. Dados recentes mostram que a composição da película salivar é altamente diversa, incluindo carboidratos (derivados da dieta e de microrganismos), ácidos graxos (principalmente triacilgliceróis e fosfolipídios) e uma gama diversificada de proteínas⁵⁶.

Nesse sentido, as proteínas adsorvidas assumem um papel importante na colonização microbiana, visto que elas proporcionam sítios de ligação para a adesão de microrganismos e subsequente formação de biofilme⁵⁵. No presente estudo, os resultados quantitativos de biomassa total, atividade metabólica e células cultiváveis mostraram que a presença de película salivar não aumentou a formação de biofilme em comparação aos modelos testados sem película salivar (Figs 1 e 2). Estudos publicados previamente, contudo, têm mostrado uma influência significativa da película salivar nos estágios iniciais de formação de biofilme^{57,58}. Superfícies de titânio e zircônia expostas previamente à saliva humana não estimulada exibiram maior aderência de *C. albicans* em comparação às superfícies não expostas à saliva, quando o microrganismo ficou em contato com as superfícies por um período de 2,5 horas⁵⁷. É provável que a mucina tenha sido responsável pela maior adesão de *Candida* às superfícies testadas⁵⁷. Por outro lado, quando uma cultura mista composta por *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* ficou em contato por 12 horas com espécimes de titânio e esmalte dentário, previamente cobertos por saliva humana não estimulada, ocorreu uma diminuição no número de células bacterianas detectadas nas superfícies testadas comparadas com as superfícies não cobertas por saliva humana⁵⁸. Os autores do estudo atribuem essa redução à presença de película salivar constituída por proteínas com efeito antibacteriano, como α -amilase, histatina 5 e cistatina S⁵⁸. Comparando os resultados previamente reportados com aqueles encontrados no presente estudo, fica evidente que a falta de influência significativa da película salivar na formação de biofilme misto de *S. pyogenes* e *C. albicans* esteja associada ao período de incubação utilizado (48 horas), o qual é maior do que os períodos analisados nos estudos supracitados (2,5 e 12 horas). Assim, é provável que a película salivar exerça uma influência significativa na formação de biofilmes essencialmente nos períodos iniciais de colonização e adesão microbiana. Outro fator que pode ter contribuído para esse resultado é a diminuição da quantidade total de proteínas na amostra final, visto que a saliva foi obtida por estimulação mastigatória de filme flexível e, posteriormente, passou por um processo de centrifugação e filtração. Esse processo foi necessário para padronizar a amostra de saliva e para eliminar células, debris e proteínas microbianas⁵⁵. Considerando que esse primeiro fator de variação não mostrou um efeito significativo na formação de biofilme misto, o uso de um modelo de biofilme *in vitro* sem exposição prévia à película salivar poderia

agilizar o tempo dos experimentos, eliminar burocracias associadas ao comitê de ética em pesquisa com seres humanos e minimizar problemas associados à diferença de composição da saliva entre diferentes doadores.

O segundo fator de variação avaliado neste estudo foi o tipo de meio de cultura, o qual mostrou um efeito significativo na formação dos biofilmes mistos. A biomassa total foi significativamente maior para biofilmes mistos formados em saliva artificial, enquanto o metabolismo foi maior quando o meio de cultura usado foi BHI caldo (Fig. 1). Para as células cultiváveis, no geral, os valores de UFCs de *C. albicans* em biofilmes mistos não foram afetados pelo tipo de meio de cultura (Fig. 2B), enquanto aqueles obtidos para *S. pyogenes* foram significativamente maiores na presença de BHI caldo (Fig. 2A). Considerando que o crescimento de *S. pyogenes* em saliva artificial foi menor, a biomassa dos modelos de biofilme com esse tipo de meio de cultura foi composta, majoritariamente, por células de *C. albicans* e pela matriz extracelular produzida por elas. Essa hipótese tem total fundamento se considerarmos, principalmente, que os resultados quantitativos dos biofilmes simples de *C. albicans* não diferiram daqueles observados para os biofilmes mistos. Além disso, as células de *Candida* (leveduras e hifas) são maiores e mais alongadas do que as células de *S. pyogenes* (cocos) e, portanto, retêm maior quantidade de VC, resultando em maiores valores de biomassa. Por outro lado, quando os biofilmes mistos foram formados em BHI caldo, o número de células cultiváveis de *S. pyogenes* foi maior, equiparando-se com os valores de *C. albicans* (Fig. 2). Neste caso, existiu um número maior de células microbianas no biofilme misto, refletindo em maior atividade metabólica em comparação aos modelos em que a saliva artificial foi usada como meio de cultura.

Quando os resultados de biomassa total, atividade metabólica e número de células cultiváveis são interpretados em conjunto (Figs 1 e 2), fica evidente que *C. albicans* se desenvolve bem nos dois tipos de meio de cultura, ao passo que o crescimento de *S. pyogenes* fica comprometido em saliva artificial. Esses achados podem estar associados à composição dos meios de cultura usados no estudo. A saliva artificial contém extrato de levedura, peptona bacteriológica, glicose, mucina e alguns sais minerais (NaCl, CaCl₂ e KCl), sendo um meio bastante usado em estudos envolvendo biofilmes de *Candida*^{42,45,51}. O meio BHI caldo, por sua vez, apresenta peptona, dextrose, NaCl, fosfato de sódio dibásico, infusão de cérebro de novilho e infusão de coração, de acordo com a descrição do fabricante. Assim, é provável que esses dois últimos componentes representam fatores de crescimento essenciais para *S. pyogenes* em ensaios *in vitro*, o que poderia explicar os maiores resultados quantitativos de metabolismo e células cultiváveis quando os biofilmes foram formados em BHI caldo. Além disso, o tipo de

carboidrato (glicose ou dextrose) presente no meio de cultura pode ter influenciado o desenvolvimento do biofilme. É provável que as células de *S. pyogenes* tenham metabolizado melhor e mais rapidamente a dextrose do que a glicose, apesar desses açúcares apresentarem a mesma fórmula química. Conseqüentemente, dentre os meios de cultura testados, a melhor opção para formação de biofilme misto seria BHI caldo, o qual não compromete o crescimento de ambas as espécies. Estudos futuros, contudo, envolvendo o desenvolvimento de uma nova formulação de saliva artificial com fatores de crescimento ideais para *S. pyogenes* e *C. albicans* são necessários para otimizar o crescimento dos biofilmes mistos e para mimetizar melhor as condições clínicas.

O último fator de variação avaliado para o estabelecimento de um modelo de biofilme misto foi a sequência de inoculação dos microrganismos. Clinicamente, o processo de formação de biofilmes é iniciado por espécies bacterianas (principalmente microrganismos do gênero *Streptococcus*), conhecidas como colonizadores primários, os quais estão em contato direto com os tecidos orais e tonsilares⁵. *Streptococcus pyogenes* seria, então, um exemplo de colonizador primário dos tecidos tonsilares. Posteriormente, por meio de um processo conhecido como coagregação, os colonizadores secundários interagem com os primários⁵⁵. Assim, a coagregação de *C. albicans* ajudaria na maturação do biofilme misto, aumentando sua complexidade estrutural, motivo pelo qual o modelo SP-CA foi inicialmente testado. Embora o modelo SP-CA mimetize melhor as condições clínicas, o presente estudo também investigou a possibilidade de *C. albicans* atuar como colonizador primário (modelo CA-SP) ou as duas espécies colonizarem a superfície ao mesmo tempo (modelo SP+CA). Como a sequência de inoculação dos microrganismos não mostrou um efeito significativo na formação dos biofilmes mistos, o modelo SP+CA torna-se extremamente interessante e vantajoso para estudos pré-clínicos *in vitro*, visto que é um modelo mais fácil de ser reproduzido e com um número menor de etapas laboratoriais envolvidas.

Outro aspecto relevante do presente estudo foi o tipo de interação estabelecida entre bactéria e fungo em biofilme misto. Para *C. albicans*, ocorreu uma interação do tipo indiferente na presença de *S. pyogenes* (Fig. 2B). Por sua vez, uma interação aditiva foi observada para *S. pyogenes*, visto que os valores de UFCs dessa espécie em biofilmes mistos foram significativamente maiores do que aqueles encontrados para biofilmes simples, e esta diferença foi ainda mais marcante quando os biofilmes foram formados em BHI caldo (Fig. 2A). Provavelmente, os valores aumentados de células cultiváveis de *S. pyogenes* estão relacionados à alta coagregação com leveduras e hifas de *C. albicans*, como ilustrado na Figura 3C. Assim, as células de *Candida* serviram como um suporte para a ancoragem e multiplicação de células

de *S. pyogenes*. A literatura mostra que a adesão entre *C. albicans* e *Streptococcus* spp. depende de adesinas bacterianas e fúngicas⁵⁹. Por exemplo, a inativação dos genes *cshA* e *cshB*, que codificam polipeptídeos de superfície celular, reduziu a adesão de *C. albicans* a *S. gordonii*⁶⁰. Cepas mutantes de *S. mutans* sem genes que codificam as glicosiltransferases B e C mostraram uma capacidade reduzida de formar biofilmes com *C. Albicans*⁶¹. Por sua vez, a adesina específica de hifa *Als3* é vital para a interação entre *C. albicans* e *Streptococcus* spp^{62,63}. *Candida albicans* também mostrou menor capacidade de formação de biofilme e níveis reduzidos de transcrição de genes específicos de hifas (*Als3*, *Ecel1*, *Hwp1*, *Sap5*) quando incubada com algumas espécies bacterianas, incluindo *S. pyogenes*²⁹. Portanto, os mecanismos específicos envolvidos na adesão entre *S. pyogenes* e *C. albicans* são multifatoriais e precisam ser melhor investigados em estudos futuros.

Considerando as vantagens discutidas previamente do modelo SP+CA, sem exposição prévia à película salivar e usando BHI caldo como meio de cultura, o mesmo foi selecionado para os ensaios de validação. Os resultados de quantificação da biomassa total (Fig. 4) e da atividade metabólica (Fig. 5) mostraram que os tratamentos dos biofilmes mistos com amoxicilina ou nistatina, de referência ou genérica, levaram a reduções de forma dose-dependente, permitindo a validação do modelo de biofilme testado. Portanto, esse modelo seria o de escolha para estudos futuros *in vitro* envolvendo os efeitos de agentes antimicrobianos, convencionais ou alternativos, sobre biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans*.

Finalmente, ao se comparar os valores de CIM dos fármacos (amoxicilina e nistatina) de referência com os genéricos para *S. pyogenes* e *C. albicans*, os dados mostraram o mesmo perfil de susceptibilidade (Tabela 1). A mesma tendência foi encontrada para os ensaios com biofilme misto (Figs 4 e 5). Estudos com humanos ou com modelos animais, contudo, têm apontado diferenças entre medicamentos de referência e genéricos. Um estudo clínico randomizado de bioequivalência que comparou dois produtos genéricos de amoxicilina com a amoxicilina de referência verificou que a confiabilidade do medicamento de referência foi 8,5 e 5,4% maior do que os dois genéricos, chegando-se à conclusão de que ambos os genéricos comercializados não são bioequivalentes ao produto líder da marca, considerando a farmacocinética do mesmo³⁴. Resultados semelhantes foram encontrados na Índia, em um estudo de bioequivalência que apontou que a cápsula genérica não possui a mesma eficácia da amoxicilina de referência³⁵. No estudo realizado por de Mattos *et al.*³⁶, três antibióticos genéricos de amoxicilina foram comparados com o seu produto de referência em relação ao nível de potência biológica e farmacocinética em ratos. Dois dos genéricos testados foram equivalentes à amoxicilina de referência em termos de potência e alcance de espectro, enquanto

apenas um genérico não supriu as expectativas. Em relação à avaliação farmacocinética, contudo, um dos genéricos com nível de potência excelente não foi compatível com a equivalência farmacocinética do medicamento de referência, enquanto que o genérico de baixa potência foi bioequivalente à amoxicilina de referência³⁶. Uma comparação direta entre os resultados reportados acima com aqueles obtidos no presente estudo não é adequada, dadas as diferenças metodológicas dos ensaios. Assim, o que se pode extrair de positivo dos achados do presente estudo, em relação à comparação entre fármacos de referência e genéricos, é que qualquer um dos dois produtos poderia ser utilizado em estudos pré-clínicos *in vitro* como controles positivos, sem que haja um prejuízo no efeito antibiofilme.

Diante do que foi avaliado no presente estudo é possível concluir que a presença de película salivar humana e a sequência de inoculação dos microrganismos não afetaram a formação de biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans*, enquanto BHI caldo é o melhor meio de cultura para a formação de tais biofilmes. O modelo SP+CA, sem exposição prévia à película salivar e usando BHI caldo como meio de cultura mostrou resposta dose-dependente frente aos tratamentos com amoxicilina e nistatina, o que permitiu a sua validação. Ainda, os fármacos (amoxicilina e nistatina) de referência e genéricos exibiram efeitos similares sobre biofilmes mistos de *S. pyogenes* e *C. albicans*. Investigações futuras analisando o comportamento de *S. pyogenes* e *C. albicans* em consórcios polimicrobianos, na presença ou ausência de antibióticos ou antifúngicos, e usando modelos de adesão ativa para formação de biofilmes são necessárias e ajudariam na seleção de um modelo *in vitro* mais realístico do ponto de vista clínico.

Referências

1. Pontin IPO, Sanchez DCJ, Di Francesco R. Asymptomatic Group A *Streptococcus* carriage in children with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016; 86:57-59.
2. Furuta SE, Weckx LLM, Figueiredo CR. Estudo clínico, duplo-cego, randomizado, em crianças com amigdalites recorrentes submetidas a tratamento homeopático. *Rev Homeop.* 2017; 80:164-173.
3. Pallon J, Sundqvist M, Rööst M, Danielsson P, Neumark T, Skovbjerg S, Svedin J, Hedin K. Presence of microorganisms in children with pharyngotonsillitis and healthy controls: a prospective study in primary healthcare. *Infection.* 2021; 49:715-724.
4. Tejesvi MV, Tapiainen T, Vänni P, Uhari M, Suokas M, Lantto U, Koivunen P, Renko M. Tonsil mycobiome in PFAPA (Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Adenitis)

- syndrome: a case-control study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 10:616814.
5. Xu H, Tian B, Shi W, Tian J, Zhang X, Zeng J, Qin M. A correlation study of the microbiota between oral cavity and tonsils in children with tonsillar hypertrophy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 11:724142.
 6. Katkowska M, Garbacz K, Stromkowski J. *Staphylococcus aureus* isolated from tonsillectomized adult patients with recurrent tonsillitis. *APMIS.* 2017; 125:46-51.
 7. Enin IP, Baturin VA, Shchetinin EV, Karpov VP, Enin IV. Microflora of palatine tonsils in chronic tonsillitis. *Vestn Otorinolaringol.* 2013; 4:21-22.
 8. Ramírez A, Peidrola D, López A, Martínez MD, Ros MJ, Corral JL, Arteaga E. Beta-hemolytic streptococci in tonsil hypertrophy and recurrent tonsillitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1997; 15:315-318.
 9. Johnson AF, LaRock CN. Antibiotic treatment, mechanisms for failure, and adjunctive therapies for infections by Group A *Streptococcus*. *Front Microbiol.* 2021; 12:760255.
 10. Stenfors LE, Fredriksen F, Räisänen S, Myklebust R. Identification of *Streptococcus pyogenes* on tonsillar epithelium during infection. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1997; 529:212-214.
 11. Abbot EL, Smith WD, Siou GPS, Chiriboga C, Smith RJ, Wilson JA, Hirst BH, Kehoe MA. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol.* 2007; 9:1822-1833.
 12. Cho KH, Caparon MG. Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology.* 2005; 57:1545-1556.
 13. Adil M, Baig MH, Rupasinghe HPV. Impact of citral and phloretin, alone and in combination, on major virulence traits of *Streptococcus pyogenes*. *Molecules.* 2019; 24:4237.
 14. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51:672-680.
 15. Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Gliosca LA, Finkelievich JL, Lovannitti CA, Rosa AC. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontol Latinoam.* 2007; 20:17-22.
 16. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23:377-383.
 17. Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48:71-74.
 18. Jokinen K, Pajarre S, Palva A, Sipilä P. Mycotic flora in tonsils and adenoids. A

- microbiological and histological evaluation. *J Laryngol Otol.* 1976; 90:945-952.
19. Kriukov AI, Kunelskaya VY, Ivoylov AJ, Izotova GN, Shadrin GB, Machulin AI. Fungal adenoiditis and tonsillomycosis in children: features of diagnosis and therapy. *Vestn Otorinolaringol.* 2019; 84:78-83.
 20. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005; 48:365-377.
 21. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 18:163-170.
 22. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19:139-143.
 23. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018; 26:229-242.
 24. Santana DP, Ribeiro EL, Menezes ACS, Naves PLF. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Rev Ciênc Med Biol.* 2013; 12:229-233.
 25. Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes*: basic biology to clinical manifestations. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
 26. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299:1-8.
 27. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med.* 2008; 59:415-428.
 28. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol.* 2004; 96:1067-1073.
 29. Park SJ, Han KH, Park JY, Choi SJ, Lee KH. Influence of bacterial presence on biofilm formation of *Candida albicans*. *Yonsei Med J.* 2014; 55:449-458.
 30. McBain AJ: Chapter 4: *In vitro* biofilm models: an overview. *Advances in Applied Microbiology* 2009; 69:99-132.
 31. Johnson AF, LaRock CN. Antibiotic treatment, mechanisms for failure, and adjunctive therapies for infections by Group A *Streptococcus*. *Front Microbiol.* 2021; 12:760255.
 32. Avianto P, Mahfudz, Suharjono, Isnaeni, Alderman CP. *In vitro* equivalence of generic and branded amoxicillin tablet by microbiological assay method. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2020; 30:/j/jbcpp.2019.30.issue-6/jbcpp-2019-0247/jbcpp-2019-0247.xml.
 33. Carbon M, Correll CU. Rational use of generic psychotropic drugs. *CNS Drugs.* 2013; 27:353-365.
 34. Del Tacca M, Pasqualetti G, Di Paolo A, Viridis A, Massimetti G, Gori G, Versari D, Taddei

- S, Blandizzi C. Lack of pharmacokinetic bioequivalence between generic and branded amoxicillin formulations. A post-marketing clinical study on healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2009; 68:34-42.
35. Pathak P, Pandit VA, Dhande PP. Bioequivalence of generic and branded amoxicillin capsules in healthy human volunteers. *Indian J Pharmacol.* 2017; 49:176-181.
36. de Mattos LIS, Ferraris FK, Machado TSC, de Brito TM, Chaves AS, Pereira HM, Pinto DP, da Silva DMD, Amendoeira FC. Post-marketing surveillance of generic amoxicillin using a microbiological assay and pharmacokinetic approach in rats. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 48:753-756.
37. Hobeika E, Farhat J, Saab J, Hleihel W, Azzi-Achkouty S, Sili G, Hallit S, Salameh P. Are antibiotics substandard in Lebanon? Quantification of active pharmaceutical ingredients between brand and generics of selected antibiotics. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2020; 21:15.
38. Darpo B, Nebout T, Sager PT. Clinical evaluation of QT/QTc prolongation and proarrhythmic potential for nonantiarrhythmic drugs: the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use E14 guideline. *J Clin Pharmacol.* 2006; 46:498-507.
39. Hassali MA, Alrasheedy AA, McLachlan A, Nguyen TA, Al-Tamimi SK, Ibrahim MIM, Aljadhey H. The experiences of implementing generic medicine policy in eight countries: A review and recommendations for a successful promotion of generic medicine use. *Saudi Pharm J.* 2014; 22:491-503.
40. Petraitis V, Petraitiene R, Lin P, Calis K, Kelaher AM, Muray HA, Mya-San C, Mickiene D, Bacher J, Walsh TJ. Efficacy and safety of generic amphotericin B in experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1642-1645.
41. Cleary JD, Rogers PD, Chapman SW. Variability in polyene content and cellular toxicity among deoxycholate amphotericin B formulations. *Pharmacotherapy.* 2003; 23:572-578.
42. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111:465-471.
43. Skutlaberg DH, Wiker HG, Mylvaganam H, Norrby-Teglund A, Skrede S. Consistent biofilm formation by *Streptococcus pyogenes emm 1* Isolated from patients with necrotizing soft tissue infections. *Front Microbiol.* 2022; 13:822243.
44. Jiang X, Lin A, Li S, Shi Y, Zhou F, Gomez GGF, Gregory RL, Zhang C, Chen S, Huang R. Effects of artificial honey and epigallocatechin-3-gallate on *Streptococcus pyogenes*. *BMC Microbiol.* 2022; 22:207.
45. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB,

- Henriques M. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2011; 27:711-719.
46. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, Crielaard W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008; 53:755-764.
47. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res*. 2005; 84:1016-1020.
48. Exterkate RA, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44:372-379.
49. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *In vitro* biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2010; 61:534-540.
50. Caldeirão ACM, Araujo HC, Tomasella CM, Sampaio C, Oliveira MJS, Ramage G, Pessan JP, Monteiro DR. Effects of antifungal carriers based on chitosan-coated iron oxide nanoparticles on microcosm biofilms. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10:588.
51. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol*. 2013; 114:1175-1183.
52. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
53. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-ninth edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.
54. Fischer NG, Aparicio C. The salivary pellicle on dental biomaterials. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2021; 200:111570.
55. Cavalcanti IMG, Ricomini Filho AP, Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Paes Leme AF, Senna PM, Del Bel Cury AA. Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol*. 2014; 59:695-703.
56. Enax J, Ganss B, Amaechi BT, Schulze Zur Wiesche E, Meyer F. The composition of the dental pellicle: an updated literature review. *Front Oral Health*. 2023; 4:1260442.
57. Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, Handel G, Gosau M. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary

pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010; 6:2307-2313.

58. Martínez-Hernández M, Reyes-Grajeda JP, Hannig M, Almaguer-Flores A. Salivary pellicle modulates biofilm formation on titanium surfaces. *Clin Oral Investig.* 2023; 27:6135-6145.

59. Bernard C, Girardot M, Imbert C. *Candida albicans* interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. *J Mycol Med.* 2020; 30:100909.

60. Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF. *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. *Infect Immun.* 1996; 64:4680-4685.

61. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH, Koo H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*. *Infect Immun.* 2014; 82:1968-1981.

62. Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF. Interaction of *Candida albicans* cell wall *Als3* protein with *Streptococcus gordonii* *SspB* adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infect Immun.* 2010; 78:4644-4652.

63. Nobbs AH, Margaret Vickerman M, Jenkinson HF. Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryot Cell.* 2010; 9:1622-1634.

Tabelas e Figuras

	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	Amoxicilina de referência	Amoxicilina genérica	Nistatina de referência	Nistatina genérica
<i>S. pyogenes</i>	0,015	0,015	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	4	4

Tabela 1. Valores de concentração inibitória mínima (MIC) de amoxicilina e nistatina, de referência e genéricas, para *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*

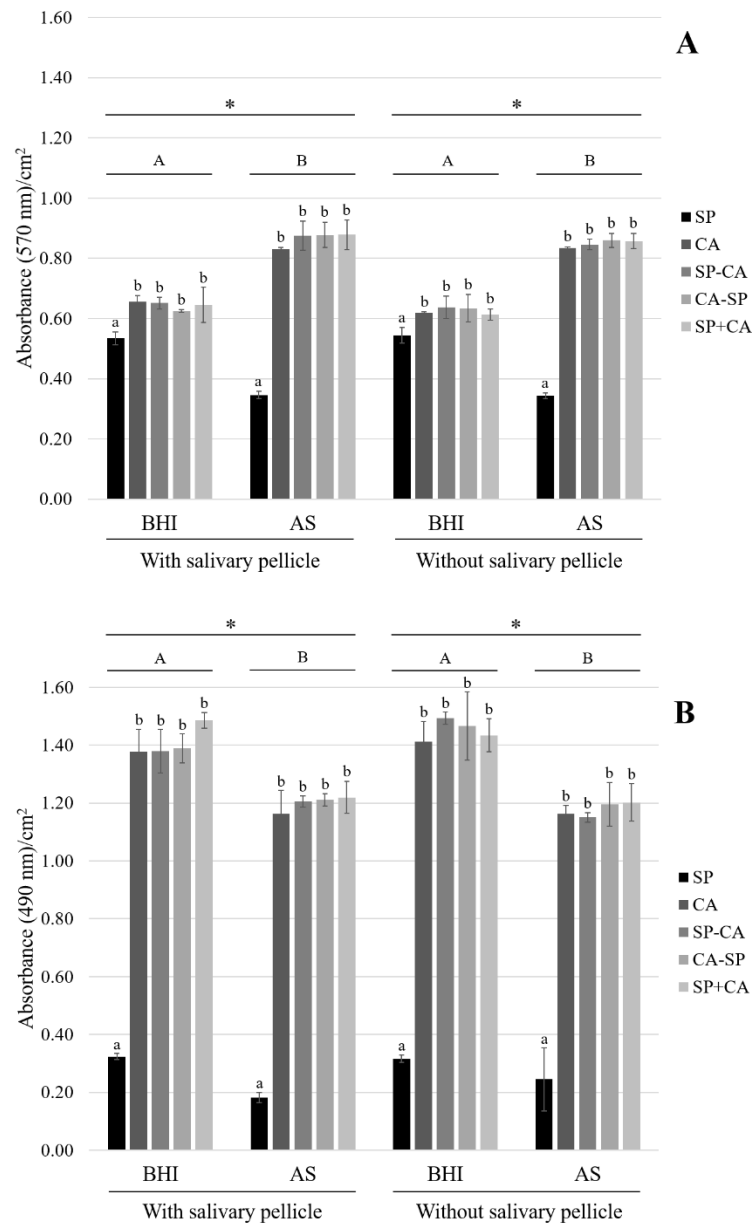


Figura 1. Valores médios e desvios-padrões de biomassa total (A) e atividade metabólica (B) de biofilmes simples e mistos de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* formados nos diferentes modelos, usando BHI caldo ou saliva artificial (AS) como meio de cultura. SP: biofilme simples de *S. pyogenes*; CA: biofilme simples de *C. albicans*; SP-CA: biofilme misto com inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*; CA-SP: biofilme misto com inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*; SP+CA: biofilme misto com inoculação das duas espécies ao mesmo tempo. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de cultura e as sequências de inoculação dos microrganismos, respectivamente, enquanto os asteriscos representam semelhanças entre os grupos com e sem película salivar humana ($p < 0,05$; ANOVA a 3 critérios e teste *post hoc* de Tukey).

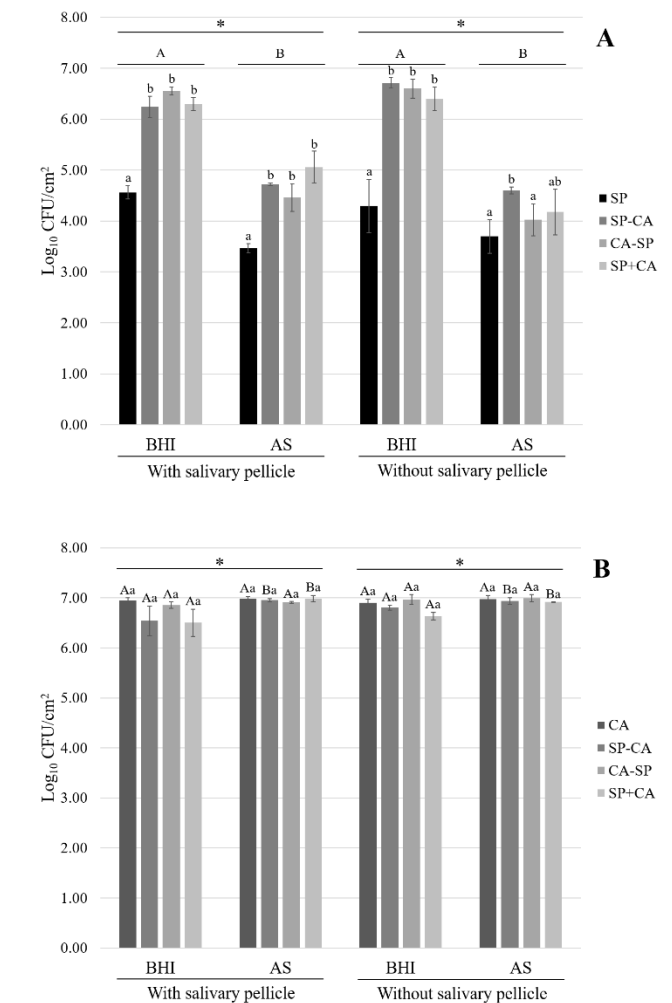


Figura 2. Valores médios e desvios-padrões do logaritmo de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pyogenes* (A) e *Candida albicans* (B) em biofilmes simples ou mistos formados nos diferentes modelos, usando BHI caldo ou saliva artificial (AS) como meio de cultura. SP: biofilme simples de *S. pyogenes*; CA: biofilme simples de *C. albicans*; SP-CA: biofilme misto com inoculação de *S. pyogenes* seguida da inoculação de *C. albicans*; CA-SP: biofilme misto com inoculação de *C. albicans* seguida da inoculação de *S. pyogenes*; SP+CA: biofilme misto com inoculação das duas espécies ao mesmo tempo. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os meios de cultura e as sequências de inoculação dos microrganismos, respectivamente, enquanto os asteriscos representam semelhanças entre os grupos com e sem película salivar humana ($p < 0,05$; ANOVA a 3 critérios e teste *post hoc* de Tukey).

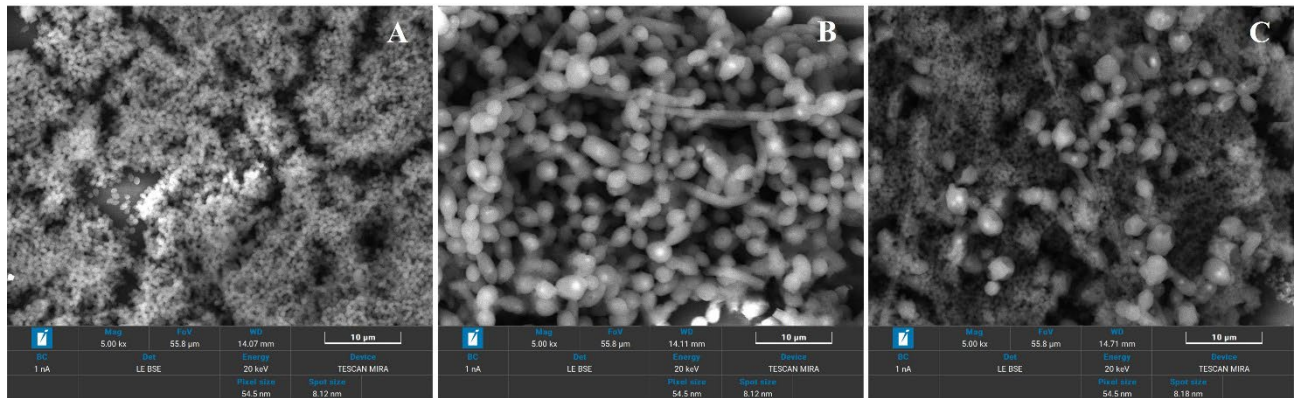


Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do biofilme simples de *Streptococcus pyogenes* (A), do biofilme simples de *Candida albicans* (B) e do biofilme misto das duas espécies (C). Os biofilmes foram formados no fundo de poços de placas de 96 poços de poliestireno sem exposição prévia à saliva humana e usando BHI caldo como meio de cultura. Para a formação do biofilme misto, as duas espécies foram inoculadas no mesmo momento. Aumento das imagens: 5,00 Kx; barras: 10 µm.

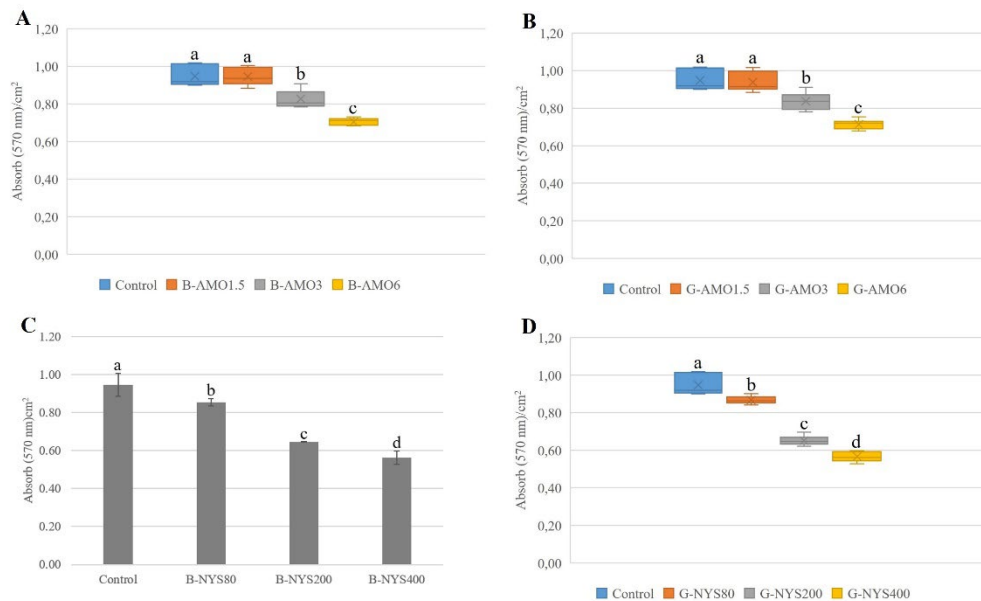


Figura 4. Resultados de biomassa total, representados por valores médios e desvios-padrões ou por medianas e quartis, de biofilmes mistos de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* tratados com amoxicilina de referência (B-AMO; A) ou genérica (G-AMO; B) nas concentrações de 1,5, 3 e 6 µg/mL. Os biofilmes também foram tratados com nistatina de referência (B-NYS; C) ou genérica (G-NYS; D) nas concentrações de 80, 200 e 400 µg/mL. Biofilmes mistos tratados com o meio de cultura puro, sem fármacos, foi o grupo controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA a 1 ou 2 critérios e teste *post hoc* de Tukey, ou Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls).

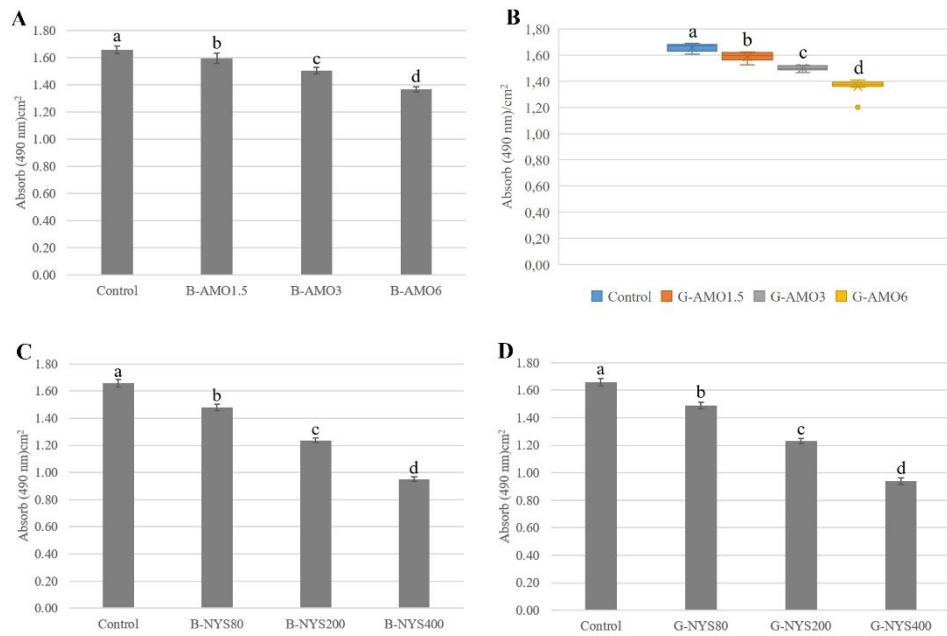


Figura 5. Resultados de atividade metabólica, representados por valores médios e desvios-padrões ou por medianas e quartis, de biofilmes mistos de *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* tratados com amoxicilina de referência (B-AMO; A) ou genérica (G-AMO; B) nas concentrações de 1,5, 3 e 6 µg/mL. Os biofilmes também foram tratados com nistatina de referência (B-NYS; C) ou genérica (G-NYS; D) nas concentrações de 80, 200 e 400 µg/mL. Biofilmes mistos tratados com o meio de cultura puro, sem fármacos, foi o grupo controle. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$; ANOVA a 1 ou 2 critérios e teste *post hoc* de Tukey, ou Kruskal-Wallis e teste de Student-Newman-Keuls).

ANEXO - Normas de Submissão

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

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

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

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

Types of Contribution

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

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the

journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details. Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (mandatory)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

Before you begin

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described

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

The author should ensure that the manuscript contains a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and have been approved by the appropriate institutional committee(s). This statement should contain the date and reference number of the ethical approval(s) obtained. Authors should also include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

The journal will not accept manuscripts that contain data derived from unethically sourced organs or tissue, including from executed prisoners or prisoners of conscience, consistent with recommendations by Global Rights Compliance on Mitigating Human Rights Risks in Transplantation Medicine. For all studies that use human organs or tissues authors must provide sufficient evidence that they were procured in line with WHO Guiding Principles on Human Cell, Tissue and Organ Transplantation. The source of the organs or tissues used in clinical research must be transparent and traceable. Authors of manuscripts describing organ transplantation must additionally declare within the manuscript.

Declaration of interest

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

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's AI policy for authors.

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Preprints

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

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously

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

Use of inclusive language

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

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the

precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The CRediT taxonomy includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. More details and an example.

Changes to Authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and to provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. More information.

Copyright

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

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must

obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Open access

Please visit our Open Access page for more information about open access publishing in this journal.

Elsevier Researcher Academy

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

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

When submitting the revised manuscript, please make sure that you upload the final version of the paper with the changes highlighted. Please remove the old version(s) of the manuscript before submitting the revised version.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text

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

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

Article structure

Manuscript Structure

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

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

Results or Findings

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

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

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

footnotes.

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

Highlights

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

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

Structured abstract

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

Keywords

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

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations,

except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

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

Statistical analysis

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

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

Acknowledgements

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

authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

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

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

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

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

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'.

Artwork

Image manipulation

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

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

Tables

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

Data references

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

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only

need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-3215-4, copies of which may be ordered online.

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Powertech Systems. (2015). Lithium-ion vs lead-acid cost analysis. Retrieved from <http://www.powertechsystems.eu/home/tech-corner/lithium-ion-vs-lead-acid-cost-analysis/>.

Accessed January 6, 2016

Reference to a dataset:

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

Reference to a conference paper or poster presentation:

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

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S. (2020, March 25). Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Data visualization

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

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article

directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

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

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

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

Mendeley Data

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

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a Research Elements journal.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the Research Elements page.

Data statement

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

After acceptance**Online proof correction**

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

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

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

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published

their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author inquiries

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

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.