

Obliquumol 'n nuwe antifungus en 'n potensiële raamwerkmolekuul uit die blare van *Ptaeroxylon obliquum* (NieshoutC) om *Candida albicans* infeksies te behandel

Authors:

Van Wyk C^{a,b}, Botha FS^a,
† Vleggaar R^c and Eloff JN^{a*}

Affiliations:

^a Fitomedisyne Program,
Dept Parakliniese
Wetenskappe, Fakulteit
van Veeartsenykunde,
Universiteit van
Pretoria, Privaatsak X04,
Onderstepoort, Suid-Afrika
^b Dept. Gemeenskaps-
tandheelkunde, Fakulteit
van Gesondheids-
wetenskappe, Skool van
Tandheelkunde, Universiteit
van Pretoria, Privaatsak
X323, Pretoria, Suid-Afrika
^c Dept Chemie,
Fakulteit Natuur- en
Landbouwetenskappe,
Unversiteit van Pretoria,
Lynwoodweg, Hatfield,
Pretoria, Suid-Afrika

Corresponding author:

JN Eloff
Tel: +27 83 627 0098
E-mail address:
kobus.eloff@up.ac.za

Dates:

Received: 07/06/2018
Accepted: 24/08/2018
Published: 03/12/2018

How to cite this article:

Van Wyk C, Botha FS,
Vleggaar R and Eloff JN,
Obliquumol 'n nuwe
antifungus en 'n potensiële
raamwerkmolekuul uit
die blare van *Ptaeroxylon
obliquum* (NieshoutC)
om *Candida albicans*
infeksies te behandel,
*Suid-Afrikaanse Tydskrif
vir Natuurwetenskap en
Tegnologie* 37(1) (2018)

An English copy of this
paper is available online at
[http://www.satnt.ac.za/
index.php/satnt/article/
view/676](http://www.satnt.ac.za/index.php/satnt/article/view/676)

Copyright:

© 2018. Authors.
Licensee: *Die Suid-
Afrikaanse Akademie vir
Wetenskap en Kuns*. This
work is licensed under
the Creative Commons
Attribution License.

In 'n voorlopige ondersoek na die aktiwiteit van asetoon blaarekstrakte van meer as 500 boomspecies teen *Candida albicans* het die ekstrak van *Ptaeroxylon obliquum* (Thunb.) Radlk. (Nieshout) baie goeie aktiwiteit gehad. Ons het die aktiewe verbindings deur 'n bioaktiwiteit-geleide proses geïsoleer. Die asetoon blaarekstrak is in vyf fraksies verdeel deur oplosmiddel-oplosmiddel fraksionering. Die chloroform fraksie het die hoogste aktiwiteit gehad en is onderwerp aan herhaalde oop-kolom kolomchromatografie. Ons het twee antifungus entiteite geïsoleer en die strukture bepaal deur kernmagnetiese resonansspektroskopie. Die eerste entiteit was 'n mengsel van β -amirien en lupeol, verbindings wat dikwels in plante aangetref word. Die tweede entiteit was 'n molekuul wat nog nie tevore gevind is nie, naamlik 8,11-Dihidro-5-hidroksie-12-hidroksiemetiel-2-metiel-4H-pirano[2,3-g]bensoksiepin-4-oon-12-O-asetaat waaraan ons die algemene naam obliquumol toegeken het. Die verbinding het hoër aktiwiteit as die positiewe kontrole amfoterisien- B teenoor *Candida albicans* gehad (MIK 0.04-0.08 teenoor 0.11). Dit het ook 'n laer sitotoksiteit op muisfibroblastelle as amfoterisien-B gehad. Obliquumol se buitengewone struktuur mag as 'n raamwerkmolekuul dien vir die ontwikkeling van nuwe antifungusverbindings.

Obliquumol, a novel antifungal and a potential scaffold lead compound, isolated from the leaves of *Ptaeroxylon obliquum* (sneezewood) for treatment of *Candida albicans* infections: In a random screening of the anti-*Candida* activity of more than 500 tree species, the acetone leaf extract of *Ptaeroxylon obliquum* (Thunb.) Radlk. (Sneezewood) had very good antifungal activity against *Candida albicans*. We isolated the compounds responsible for the antifungal activity by bio-assay guided fractionation. The acetone leaf extract was separated into five fractions by solvent-solvent fractionation. The chloroform fraction was subjected to repeated open column silica gel chromatography. We isolated two antifungal entities and determined the structures by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The first entity was a mixture of β -amyrin and lupeol found frequently in other plants that we could not separate. The second entity was a novel compound not isolated before 8,11-Dihydro-5-hydroxy-12-hydroxymethyl-2-methyl-4H-pyrano[2,3-g][1]benzoxepin-4-one 12-O-acetate given the trivial name of obliquumol. Obliquumol had a higher activity against some *Candida albicans* isolates than amphotericin B, the positive control (MIC of 0.04-0.08 compared to 0.11mg/ml) and lower cellular cytotoxicity against mouse fibroblast cells than amphotericin B. The structure of obliquumol may represent a low toxicity new scaffold molecule for the development of antifungal compounds.

Keywords: antifungal, isolation, structure elucidation, minimum inhibitory concentration, cytotoxicity

Inleiding

Dir word wyd aanvaar dat die groeiende weerstand teen antibiotika deur mikroorganismes 'n groot probleem is. Een outeur het al gestel dat ons die gebied begin betree waar geen effektiewe antibiotika teen bakterieë meer beskikbaar gaan wees nie (Berkowitz 1959). Daar is ook 'n toenemende weerstand teen fungi. Die belang om nuwe antifungus verbindings uit plante van Afrika te ondersoek, is beklemtoon (Hostettman et al. 2000). Van Wyk et al. (2009) het behandelings wat tans gebruik word en die potensiaal van plant-gebaseerde medisyne om *Candida albicans* veral in mondelinge candidiase te beheer, bespreek. Pasiente wat MIV positief is het 'n verhoogde vatbaarheid vir *C. albicans* infeksies. (Owotade et al. 2016).

Infeksies met *C. albicans* is 'n wêreldwye probleem met 'n beraamde 75 miljoen gevalle per jaar vir vaginale en 9.5 miljoen gevalle van spysvertering- en urienweginfeksies (Vandeputte et al. 2012). Africa en Abrantes (2016) het 'n oorkoepelende oorsig van weerstandigheid in Afrika waar 'n hoë voorkoms van MIV is, gelewer. Die weerstandigheid teen ander patogeniese fungi is ook verhoog. Suid-Afrika het die hoogste, bykans 50%, nie-Candida flukonasool weerstand van baie lande wat ondersoek is (Wiederhold 2017).

Die Fitomedisyne Program het die aktiwiteit van asetoon blaarekstrakte van meer as 500 boomsoorte wat in botaniese tuine groei teen agt belangrike patogeniese mikroorganismes, wat *C. albicans* ingesluit het, bepaal. Die hoofdoel van die projek was om te bepaal of daar 'n korrelasie is tussen taksonomie en antimikrobiële aktiwiteit. 'n Mate van sukses is op ordevlak behaal (Pauw en Eloff, 2014)

In hierdie projek het sekere plantekstrakte uitstekende aktiwiteit teen een of meer mikroorganismes gehad. 'n Asetoon blaarekstrak van 'n *Ptaeroxylon obliquum* boom in die Manie van der Schijff botaniese tuin in die Universiteit van Pretoria het 'n minimum inhiberende konsentrasie (MIK) van 0.07 mg/ml teen 'n ATCC isolaat van *C. albicans* gehad. 'n Herbariumeksemplaar is in die HGJW Schweickerdt Herbarium van die Universiteit van Pretoria geplaas. In hierdie bydrae beskryf ons die isolering en karakterisering van twee bekende en een nuwe verbinding met antifungusaktiwiteit uit die blare van *Ptaeroxylon obliquum*.

Ptaeroxylon is 'n monotipiese genus en die enigste spesie kom net in suidelike Afrika voor. Die genus is oorspronklik in die Ptaeroxylaceae geplaas, maar die APG klassifikasiesetel (2003 en 2009) het nou al die spesies in die Rutaceae familie geplaas. *Cedrelopsis* met verskeie spesies kom slegs in Madagaskar voor (Mulholland et al. 2000). Die bas van *P. obliquum* bevat 'n wye verskeidenheid van eenvoudige en geprenileerde 6,7 dioksigenaatkoumariene en 5,7 dioksigenaatgeprenileerde chromone (Dean en Taylor 1967). 'n Etielasetatekstrak van gemaalde *P. obliquum* kernhout bevat die chromoon peusenien, wat voorheen uit die wortels van *Peucedanum ostruthium* Koch (Umbelliferae) geïsoleer is. Die ekstrak bevat ook desoksikerenien en karenien, die isomeriese koumariene 7-0-(3,3-dimetielalliel) skopoletien, nieshoutien en nieshoutol en die alomteenwoordige β -sitosterol. Die bas bevat ook die ongewone aromadendraan diterpenoïed cneurubin X (Mulholland et al. 2000). Die hout is chemies baie kompleks en bevat talle ongewone chromone en ander fenoliese verbindinge. Dit wil voorkom asof min fitochemiese werk op die blare van *P. obliquum* gedoen is.

Ptaeroxylon obliquum (Thunb.) Radlk. (Nieshout) is 'n medisinale plant wat vir verskeie indikasies gebruik word. Dit kom natuurlik voor op die oostelike kusvlaktes van Suid-Afrika en Noord tot in Limpopo provinsie (van Wyk et al. 2002) Die verpoëide hout word gesnuif vir die behandeling van rumatiek en hartsiektes. Die bas word

gebruik om rumatiek en artritis te behandel (Watt & Breyer-Brandwijk, 1962). Dit is waarskynlik die chromone in die bas wat die nies induseer nadat dit gesnuif is. Perforatin A, uit die blare geïsoleer is aktief teen hoë bloeddruk (van Wyk et al. 2002). Die doel van hierdie studie was om die verbindinge in die blare wat verantwoordelik is vir die antifungusaktiwiteit teen *Candida albicans* (ATCC 10231) te isoleer en karakteriseer.

Materiaal en metodes

Gesonde blare is versamel van 'n boom in die Manie van der Schijff botaniese tuin op die Hatfield kampus van die Universiteit van Pretoria en ook later van die Laeveld Nasionale Botaniese Tuin en Pretoria Nasionale Botaniese Tuin. Die blare is by kamertemperatuur gedroog in 'n lugstroom en fyn gemaal. Die fyngemaalde droë blare is met asetoon ge-ekstraheer in die verhouding van 10 ml per g Asetoon het baie voordele om plante te ekstraheer om antimikrobiële verbindinge te kry (Eloff 1988a). Die ekstrak is gefiltreer deur Whatman # 1 filtreerpapier in 'n Büchner tregger. Die asetoon is verwyder in 'n Büchi rolfilesindampapparaat onder verlaagde druk.

Die oplosmiddel-oplosmiddel fraksioneringproses deur die Nasionale Kankerinstituut in die VSA ontwikkel, is gewysig deur die koolstoftetrachloried stap uit te laat. Dit het gelei tot vyf fraksies met verskillende polariteite (Suffness en Douros 1979; Eloff 1998b).

'n Reeksverduunning mikroplaatmetode met p-jodonitrotetrasoliumpers (INT) as indikator van mikrobiële groei is toegepas op fraksies en geïsoleerde verbindinge om die minimum inhiberende konsentrasie (MIK) te bepaal (Eloff 1988c). Kortliks is 'n reeks tweevoudige verdunnings van die 10 mg/ml ekstrak of fraksie in die putjies en 'n 96 put mikroplaat geplaas. Die 100 μ l volumes is geïnokuleer met 100 μ l van die aktief-groeiende *C. albicans* kultuur en vir 12 en 24 uur gekweek. Hierna is 40 μ l van 'n 2 mg/ml INT in water in elke putjie bygevoeg en gekweek totdat die kulture rooipers geword het deurdat die liggeel INT na rooipers gereduseer is deur lewende *C. albicans* selle. Die selle is blootgestel aan 2.5, 1.25, 0.63, ens mg/ml van die ekstrak. Die laagste konsentrasie wat tot 'n verlaging in die kleurintensiteit gelei het, verteenwoordig die MIK. Asetoon en amfoterisien-B wat ook tweevoudig verdun is, is as negatiewe en positiewe kontroles gebruik. Al die eksperimente is drie keer herhaal. Omdat dit op 'n tweevoudige verdunning gebaseer is, was die standaardafwyking gewoonlik 0. Die verskillende *C. albicans* isolate wat gebruik is, is van die American Type Culture collection (ATCC 10231) of as kliniese isolate van pasiënte by die tandheelkundige hospitaal van die Universiteit van Pretoria bekom. Isolate is in aartappeldekstrose groeimedium (Oxoid, Basingstoke, Verenide Koninkryk) gekweek.

Die sitotoksiteit van ekstrakte, fraksies en verbindinge teen muisfibroblaste is bepaal met die metode van Mossman (1983). Berberien is as positiewe kontrole gebruik.

TABLE 1: MIK in mg/ml van drie fraksies van aseton blaarekstrakte teen een ATCC en ses kliniese isolate van *Candida albicans*

	ATCC 10231	M0824	M0825	M0826	1051604	1051608	1051255	Gemiddeld
Heksaan	0.169	0.683	0.336	0.169	0.169	0.169	0.266	0.28
Chloroform	0.179	0.179	0.045	0.022	0.022	0.022	0.070	0.08
Etielasetaat	0.740	0.740	0.091	0.091	0.091	0.091	0.276	0.30
Amfoterisien B	0.11	0.03	0.03	0.06	0.06	0.11	0.03	0.06

Omdat die chloroformfraksie die hoogste antifungus-aktiwiteit gehad het en, gebaseer op outobiografie, die meeste antifungusverbindings bevat het, is dit gekies om die aktiewe verbindings te isoleer. Herhaalde oop kolom silikajelchromatografie met oplosmiddels van toenemende polariteit is toegepas. Fraksies met ooreenstemmende dunlaagplaat chromatogramsamestelling is saamgevoeg en verdere fraksionering is gebaseer op die antifungus-aktiwiteit.

Twee entiteite wat nie verder met dunlaagchromatografie met verskillende elueermiddels geskei kon word nie, is geïsoleer. Kernmagnetiese resonansspektroskopie (Bruker Avance III-400 spektrometer) is gebruik om die strukture te bepaal grotendeels deur 1D KMR (1H, 13C and DEPT) en 2D KMR (HSQC, HMBC and COSY), massa spektroskopie en deur vergelyking met literatuurdata.

Resultate en bespreking

MIK van ekstrakte en fraksies

Die verskillende fraksies gebaseer op polariteit het sterk verskil in aktiwiteit teen die *C. albicans* isolate met MIKs wat varieer het van 22 tot 740 µg/ml (Tabel 1). Die chloroformfraksie was gemiddeld baie meer aktief as die ander fraksies. Die aktiwiteit teenoor drie van die isolate was selfs hoër as die aktiwiteit van amfoterisien-B, die positiewe kontrole. Die hoër aktiwiteit en die feit dat die chloroform fraksie die meeste aktiewe verbindings teen *C. Albicans* gehad het (resultate nie weergegee nie) het tot die keuse van die fraksie vir verdere fraksionering gelei. Die

metanol-water fraksie het prakties geen aktiwiteit gehad nie met 'n MIK van 2 500 µg/ml.

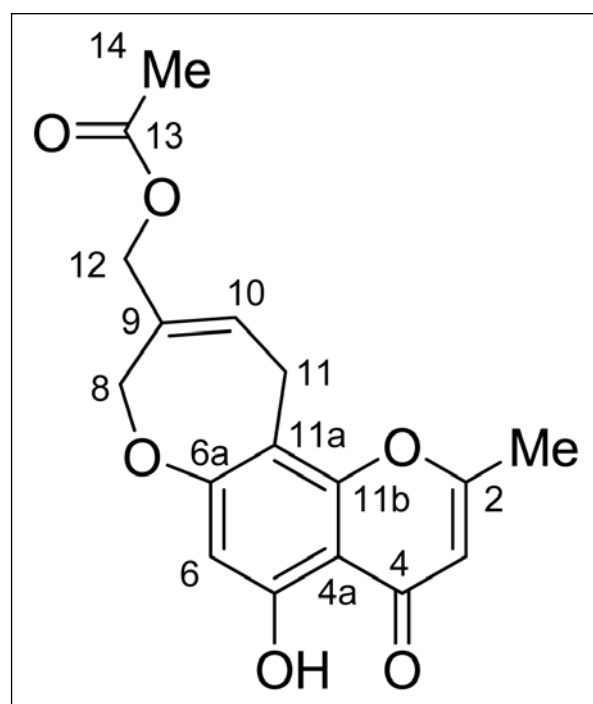
Isolering en karakterisering van anti-fungus verbindings
Twee entiteite wat nie tot meer as een verbinding geskei kon word deur kolom- of dunlaagchromatografie met die elueerstelsels wat ons dikwels gebruik nie (Kotze & Eloff 2002) en met goeie aktiwiteit (Tabel 1), is geïsoleer.

Entiteit 1 het bestaan uit twee verwante verbindings β-amirien and lupeol. Hierdie verbindings kom wyd verspreid in plante voor en die antifungusaktiwiteit is bekend.

Verbinding 2 was suiwer en die 1D en 2D NMR verskuiwings (Tabel 2) het nie ooreengestem met enige bekende verbinding nie. Die verbinding is geïdentifiseer as 8,11-dihidro-5-hidroksie-12-hidroksiemetil-2-metil-4H-pirano[2,3-g]bensoksiepin-4-oon-12-O-asetaat (Figuur 1). Dit is die 12-O-asetaat derivaat van erantien wat voorheen geïsoleer is. Ons het die verbinding 'n algemene naam obliquumol gegee na aanleiding van die spesies epiteton. Die struktuur van die liniêre isomeer van erantien-O-asetaat is gepubliseer, maar dit is nie dieselfde verbinding as obliquumol nie (Bruder et al. 2010).

TABEL 2: ¹³C NMR data van obliquumol in CDCl₃

Atoom	δC	δH	HMBC (H→C)
2	167.14 S		–
3	108.66 D	3 5.99 q (J 0.7)	C-2, C-4, C-4a, 2-CH ₃
4	182.68 S	–	–
4a	106.72 S	–	–
5	155.79 S	–	–
6	99.29 D	6.47 s	C-4, C-6a, C-5, C-11a, C-4a
6a	164.39 S	–	–
8	71.04 T	4 4.61 tt (J 1.6, 1.6)	C-6a, C-9, C-10, C-12, C-11
9	133.23 S	–	–
10	128.30 D	2 6.02 tt (J 5.5, 1.2)	C-11a, C-8, C-12, C-15
11	21.14 T	6 3.52 d (J 5.6, 1.2, 1.6)	C-6a, C-11b, C-9, C-10, C-11a
11a	115.82 S	–	–
11-b	158.06 S	–	–
12	66.45 T	5 4.41 br s	C-9, C-10, C-8, C-13
2-Me	20.78 Q	7 2.30 d (J 0.7)	C-2, C-3
5-OH	–	12.94 br s	–
13	170.61 S	–	–
14	20.42 Q	8 2.01	C-13

**FIGUUR 1:** Struktuur van obliquumol geïsoleer uit *P. obliquum* blare:8,11-dihidro-5-hidroksie-12-hidroksiemetil-2-metil-4H-pirano[2,3-g] [1] bensoksiepin-4-oon 12-O-asetaat

TABEL 3: Minimum inhiberende konsentrasies in mg/ml van die geïsoleerde verbindings teen ATCC 10231 en kliniese isolate van *Candida albicans* en amfoterisien-B na 12 and 24 uur inkubering*

Verbinding	Inkubering in uur	ATCC 10231	M0824	M0825	M0826	1051604	1051608	1051255
lupeol/ β -amirien	12	0.004	> 0.25	> 0.25	> 0.25	> 0.25	0.004	> 0.25
	24	0.004	> 0.25	> 0.25	> 0.25	> 0.25	0.25	> 0.25
obliquumol	12	0.004	> 0.25	> 0.25	> 0.25	> 0.25	0.008	> 0.25
	24	0.004	> 0.25	> 0.25	> 0.25	> 0.25	0.25	> 0.25
amfoterisien B	12	0.11	0.03	0.03	0.06	0.06	0.11	0.03
	24	0.11	0.11	0.06	0.11	0.06	0.11	1.23

* daar was geen groei-inhibering met die hoogste konsentrasie (25%) van die negatiewe kontrole, asetoon nie

'n Vergelyking van die 1H KMR spektrum met die beperkte data van Epe en medewerkers en erantien-12-O- β -D-glikosied (Junior 1979) dui die verskil met obliquumol duidelik aan. Die sintese van die na-verwante isomeriese okepinochroomoon erantien is beskryf (Bruder et al., 2010). Die molekulêre formule van obliquumol is deur akkurate massa spektrometrie bepaal as $C_{17}H_{16}O_6$. Die $[M+H]^+m/z$ van 339.0840 vir $C_{17}H_{16}O_6$ vergelyk goed met die berekende waarde van 339.0845. Die verbinding is nog nie bekend as 'n natuurprodukt vir so vêr as ons kon vasstel uit die Dictionary of Natural Products (1996) nie.

Die lupeol/ β -amirien mengsel en obliquumol het die groei van *C. albicans* ATCC 10231 by 'n baie laer konsentrasie (0.004 mg/ml) inhibeer as amfoterisien B (0.11 mg/ml) (Tabel 3). Obliquumol het hoë aktiwiteit teen die ATCC lyn gehad, maar was nie so aktief teen die meeste kliniese isolate nie. Obliquumol het fungisidiese aktiwiteit teen die ATCC 10231 lyn gehad, maar was waarskynlik fungistaties teen die isolaat 1051608 gebaseer op die MIK waardes na 12 en 24 uur.

Sitotoksiteit en selektiwiteitsindeks

Die sitotoksiteit teenoor muisfibroblastselle is bepaal deur die MTT metode (Mossman, 1983). Die konsentrasie

wat 50% van die selle doodgemaak het (LK_{50}) is bereken. Berberien is gebruik as 'n positiewe kontrole. Amfoterisien B met 'n LK_{50} van 1.46 $\mu\text{g/ml}$ was meer toksies teen muisfibroblastselle as berberien (Tabel 4). Die sitotoksiteit van obliquumol ($LK_{50}=7.23 \mu\text{g/ml}$) was heelwat laer as die van amfoterisien B ($LK_{50}=1.46 \mu\text{g/ml}$).

Die selektiwiteitsindeks dui die relatiewe veiligheid van die getoetsde produk aan en hoe hoër die waarde is, hoe veiliger is die produk. Die effektiwiteitsindeks word bereken deur die sitotoksiteit deur die MIK in dieselfde eenhede te deel. The selektiwiteitsindeks vir die β -amirien and lupeol mengsel was baie laag-tussen 0.000004 and 0.00025. Hierdie mengsel is dus baie meer toksies vir die fibroblastselle as vir die *C. albicans* selle. In sommige gevalle was die effektiwiteitsindeks vir amfoterisien-B hoër as vir obliquumol wat hoër veiligheid aandui (Tabel 5). Die gemiddelde selektiwiteitsindeks van obliquumol (0.41) was egter 12.5 keer hoër as die waarde vir amfoterisien-B (0.03). Alhoewel die selektiwiteitsindeks van obliquumol net vir die standaard ATCC lyn hoër as 1 was, is die aanwending van medikasie vir kandidiasis in meeste gevalle 'n lokale aanwending of mondelinge of vaginale uitspoeling. Dit is bemoedigend dat obliquumol 'n hoër gemiddelde selektiwiteitsindeks het as amfoterisien-B, die medikasie wat tans gebruik word.

Samevatting

Die laaste raamwerkmolekuul vir antifungus verbindings nl. Amfoterisien-B is in 1956 ontdek. Obliquumol verteenwoordig 'n geheel en al nuwe struktuur met beter antifungusaktiwiteit teen sekere *C. albicans* isolate en hoër sellulêre veiligheid as amfoterisien-B. Alhoewel dit laer aktiwiteit teen seker kliniese isolate het, mag veranderinge aan die basiese struktuur die aktiwiteit verhoog teen weerstandige fungi.

Die sitotoksiteit van obliquumol ($LK_{50} 7.23 \mu\text{g/ml}$) was vier keer laer as die sitotoksiteit van amfoterisien-B ($LK_{50} 1.46$

TABEL 4: Konsentrasie in $\mu\text{g/ml}$ van ekstrakte, fraksies en verbindings wat tot 50% sterfte van fibroblastselle en gemiddelde MIK teen verskillende *C. albicans* isolate.

Entiteit getoets	LC50	MIC in $\mu\text{g/ml}$
Nieshout asetoon blaarekstrak	35.6	70
Heksaanfraksie	2012.0	280
Chloroformfraksie	28.6	80
Etielasetaatfraksie	229.7	300
Waterfraksie	0.08	>2500
Mengsel β amirien en lupeol	0.001	*
Obliquumol	7.2	*
Amfoterisien B	1.5	*
Berberiene positiewe kontrole	9.0	NA

* Waardes het gewissel, Kyk Tabel 3

TABEL 5: Selektiwiteitsindeks (SI) van die geïsoleerde verbindings teen *C. albicans* standaardisolaat (ATCC 10231) en kliniese isolate

Verbindings	<i>Candida albicans</i>						
	Kliniese isolate						
	ATCC 10231	M0824	M0825	M0826	1051604	1051608	1051255
Obliquumol	1.80	0.03	0.03	0.03	0.03	0.90	0.03
Amfoterisien B	0.01	0.05	0.05	0.03	0.03	0.01	0.05

µg/ml). Dit is bemoedigend veral as die potensieële produk as 'n mond of vaginale spoelmiddel teen candidiase gebruik word. Verbindings wat die vashegting van *C. albicans* aan mondelinge mukosa inhibeer, mag voordelig wees om mondelinge infeksies te beheer. Die moontlikheid bestaan dus om 'n nuwe vaginale, mondelinge of antifungale produk gebaseer op obliquumol of 'n derivaat daarvan te ontwikkel. Sitotoksiteit is ook nie noodwendig 'n aanduiding van heeldier toksisiteit nie omdat baie ander faktore 'n rol kan speel. Dit is belangrik om die veiligheid in dierestudies te bepaal. Daarvoor moet voldoende materiaal egter beskikbaar wees.

Bydrae van outeurs

CvW het die verbinding geïsoleer en aktiwiteit bepaal. FSB het die eerste konsep van die artikel geskryf. Oorlede RV het die struktuur van die geïsoleerde verbinding bepaal. JNE het die plant geïdentifiseer, toesig gehou oor die isolering van die verbinding, die finale manuskrip geredigeer en as korresponderende outeur opgetree.

Erkenning

Dr Ahmed Aroke het gehelp met die isolering van die aktiewe verbindings. Die Universiteit van Pretoria en die Nasionale navorsingstigting het befondsing aan FSB en JNE voorsien. 'n Anonieme keurder het waardevolle kommentaar gelewer wat die kwaliteit van die manuskrip verhoog het. Die Kuratore van die Botaniese tuine het ons toegelaat om blare te versamel.

Verwysings

- Africa, C.W.J., Abrantes, P.M.D.S. 2016. *Candida* antifungal drug resistance in sub-Saharan African populations: A systematic review F1000 Research, 5:2832 (doi: 10.12688/f1000research.10327.1)
- Berkowitz, F.E. 1995. Antibiotic resistance in bacteria. The wake-up call has come. *Southern Medical Journal* 88: 797-804.
- Bruder, M., Haseler, P.L., Muscarella, M., Lewis, W., Moody, C.J. 2010. Synthesis of the Oxepinochromone Natural Products Ptaeroxylin (Desoxykarenin), Ptaeroxylinol, and Eranthin. *J Org Chem* 75, 353-358.
- Dean, F.M., Taylor, D.A.H. 1966. Extractives from East African timbers. Part II. Ptaeroxylin obliquum. *J Chem Soc (C)* 114-116.
- Eloff J.N.1998a Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60, 1-8.
- Eloff J.N.1998b The presence of antibacterial compounds in *Anthocleista grandiflora* [Loganiaceae] *South African Journal of Botany* 64, 209-212.
- Eloff J.N.1998c A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64, 711-714.
- Dictionary of Natural Products. 1996. CD-ROM, release 4:2. Chapman and Hall: London.
- Hostettmann, K., Marston, A., Ndjoko, K., Wolfender, J.-L. 2000. The potential of African plants as a source of drugs. *Current Organic Chemistry* 2000, 4, 973-1010.
- Junior, P. 1979. Eranthin und eranthin-β-D-glucosid: zwei neue chromone aus *Eranthis hiemalis*. *Phytochemistry* 18, 2053-2054.
- Kotze, M. and Eloff, J.N. 2002. Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African Journal of Botany* 68, 62-67.
- Martini, N. and Eloff, J.N. 1998. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol* 62, 255-263.
- McCabe, P.H., McCrindle, R., Murray, R.D.H. 1967. Constituents of sneezewood, *Ptaeroxylin obliquum* (Thunb.) Radlk. Part I. Chromones. *J Chem Soc* 145-151.
- Mondon, A., Epe, B., Trautmann, D. 1978. Information on the bitter compounds in the *Cneoraceae*. *Tetrahedron Letters* 19(49), 4881-4884.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Mulholland, D.A., Parel, B. and Coombes, P.H. 2000. The chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxyloaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. *Current Organic Chemistry* 4, 1011-1054.
- Owotade, J.F., Gulube, Z., Ramla, S. and Patel, M. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolated from the oral cavities of patients with HIV infection and cancer. *South African Dental Journal* 2016; 71: 8-11.
- Pauw, E. and Eloff, J.N. 2014. Which tree orders in southern Africa have the highest antimicrobial activity and selectivity against bacterial and fungal pathogens of animals? *BMC Compl and Altern Med* 2014, 14:317 doi:10.1186/1472-6882-14-317 (8 pages)
- Suffness, M., Douros, J., 1979. Drugs of plant origin. *Methods in Cancer Research* 26, 73-126.
- Trautmann, D., Epe, B., Oelbermann, U., Mondon, A. 1980. Diterpenes from *Cneoraceae*, I. Constitution and configuration of Cneorubines. *Chem Ber* 113, 3848-3865.
- Van Wyk, B.-E., Van Oudtshoorn, B., Gericke, N. 2002. *Medicinal plants of South Africa*. Pretoria, Briza Publications.
- Van Wyk, C., Botha, F.S., Steenkamp, V. 2009. In vitro antimicrobial activity of medicinal plants against oral *Candida albicans*. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3, 26-30.
- Vandeputte, P., Ferrari, S. and Coste, A.T. 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012, Article ID 713687, doi:10.1155/2012/71368726.
- Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G. 1962. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2nd ed. London: Livingstone.
- Wiederhold N.P. 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist.* 10: 249-259.