



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

JÉSSICA DIANE DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES
DE *Streptococcus mutans* SOBRE *Candida albicans* EM MODELOS
DE ESTUDO *in vivo***

2018

JÉSSICA DIANE DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE
Streptococcus mutans SOBRE *Candida albicans* EM MODELOS DE ESTUDO
*in vivo***

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Jéssica Diane dos

Atividade antifúngica do extrato bruto e frações de *Streptococcus mutans* sobre *Candida albicans* em modelos de estudo in vivo / Jéssica Diane dos Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. *Streptococcus mutans*. 2. *Candida albicans*. 3. Candidose experimental. 4. *Galleria mellonella*. 5. Camundongos imunossuprimidos. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito
Faculdade de Pindamonhangaba (Fapi)

São José dos Campos, 15 de janeiro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos amores da minha vida:

À minha Mãe Roseli

*Que com seu cuidado e dedicação foi quem me deu em alguns momentos a
esperança para seguir.*

*Agradeço pela sua determinação e luta na minha formação, pelo suporte ao
longo da minha vida para que tudo que planejei pudesse ser realizado. Sem a sua
compreensão, ajuda e confiança nada disso seria possível.*

*Obrigada por me ensinar a nunca desistir, mostrando que o nosso caminho
deve ser seguido sem medo, fossem quais fossem os obstáculos...*

Você é o meu maior exemplo!

À minha Filha Yasmin

*Minha força, meu anjo, que iluminou de maneira especial os meus
pensamentos, me levando a buscar sempre mais conhecimento.*

Obrigada por me mostrar o que é amor incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, por me iniciar e motivar no universo da pesquisa sempre com muita paciência, dedicação e apoio. Por todo conhecimento transmitido e solicitude para conduzir a minha orientação. É um grande privilégio poder ter sido sua orientada durante esses 7 anos, em minha Iniciação Científica e Mestrado. Serei eternamente grata por todo o aprendizado e oportunidades.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, primeiramente por abrir as portas do laboratório, por compartilhar de toda sua experiência fundamental ao meu crescimento acadêmico. E mesmo não estando mais presente todos os dias no laboratório, agradeço sua prontidão em sempre nos ajudar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me guiar e iluminar ao longo desta jornada.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira e vice-coordenador Prof. Adj. Mauro Pedrine Santamaria, pelo apoio constante para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa no início do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado (processo 2016/03395-4).

À Profa. Adj. Dulce Helena Siqueira Silva pela parceria tão importante no desenvolvimento desse projeto, sem a qual não seria possível sua realização.

À aluna de Pós-doutorado Rebeca Previante Medina, pela grande ajuda, ensinamentos, disponibilidade e amizade. Sem a sua colaboração este trabalho não teria sido realizado.

À Beth Helen Fuchs e Eleftherios Mylonakis pela recepção, orientação e concessão de bolsa internacional de pesquisa no laboratório de Doenças Infecciosas do Rhode Island Hospital, por meio do programa Brown-Brazil Initiative da Brown University, que me proporcionou crescimento profissional e pessoal extraordinário.

À Profa Adj. Ana Lia Anbinder, pela sua disponibilidade e auxílio durante a fase experimental.

Ao Carlos Guedes e Michele Ramos dos Santos, pela paciência em me ajudar sempre que necessário.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e à bibliotecária Renata Aparecida Couto Martins que orientou sua normalização.

À todos os professores pelo convívio durante a realização das disciplinas, pelo apoio e ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, que foram essenciais para qualidade da pesquisa.

Ao técnico do laboratório de patologia Walter Cruz, pelo cuidado e auxílio na preparação dos cortes histológicos.

Ao técnico do biotério, Antonio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcellos pelos ensinamentos e paciência.

A querida amiga e parceira de trabalho Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, pela amizade, disponibilidade, pela companhia nas viagens à Araraquara, e imenso auxílio durante todo o trabalho. Sem a sua ajuda seria muito mais difícil.

A aluna de iniciação Científica, Karina Levy Bentubo pela ajuda e amizade.

Ao meu namorado Jhonattan Lucas Nunes de Souza, por toda paciência, compreensão, carinho e amor, e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando eu acreditava nem existir.

À Janaína Araújo de Alvarenga, pelos 8 anos de amizade, que começou na graduação, agora na pós-graduação e com certeza para toda a vida. Agradeço imensamente pela paciência, pelos momentos de descontração e por toda ajuda dentro e fora do laboratório.

À Marisol dos Santos Velloso, pelas trocas de conhecimento e experiências tão importantes. Por fazer parte da minha jornada na microbiologia através da Iniciação Científica, o que nos proporcionou uma grande amizade.

À Maíra Terra Garcia, pela amizade e ajuda em todos os momentos que precisei. Por estar ao meu lado sempre, me animar em momentos difíceis.

Ao Felipe de Camargo Ribeiro, por estar sempre disposto a ajudar, principalmente durante o trabalho no Biotério.

Aos amigos, alunos de Pós-Graduação, companheiros do Laboratório de Microbiologia, Ana Carolina Chipoletti, Fernanda Freire, Lívia Mara Figueiredo, Patrícia Pimentel de Barros, Rafaella Braga, Rodnei Dennis Rossoni e aos demais colegas pela disposição, carinho, paciência e pelos momentos de descontração. Todos foram essenciais para o bom andamento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Líliliana Scorzoni pela companhia, sua boa vontade e por estar sempre disposta a nos ajudar.

A todos os funcionários do ICT-UNESP, em especial à equipe da Seção Técnica de Pós-Graduação, pela paciência, prontidão no atendimento, e amizade conquistada durante o curso de mestrado.

A minha querida família e amigos, agradeço pelo carinho e apoio em todos os momentos difíceis.

A todos, enfim, que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“As tarefas que nos propomos devem conter exigências que pareçam ir além de nossas forças. Caso contrário, não descobrimos nosso poder, nem conhecemos nossas energias escondidas, e assim deixamos de crescer.”

Leonardo Boff

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	20
2.1 Objetivo geral	20
2.1.1 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Micro-organismos	21
3.2 Comitê de Ética	21
3.3 Preparo do extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	22
3.3.1 Preparo do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	22
3.3.2 Extração e fracionamento do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	22
3.3.3 Identificação das substâncias presentes no extrato bruto e frações obtidas do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	26
3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato e frações do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i> sobre <i>C. albicans</i>	27
3.5 Efeitos do extrato bruto e frações da cultura de <i>S. mutans</i> sobre a candidose experimental no modelo de <i>Galleria mellonella</i>	27
3.5.1 Grupos experimentais.....	27
3.5.2 Preparo da suspensão padronizada de <i>Candida albicans</i>	29
3.5.3 Injeção dos micro-organismos em <i>G. mellonella</i>	29
3.5.4 Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	31
3.5.5 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL.....	31
3.5.6 Densidade hemocitária	32
3.6 Efeitos do extrato bruto e frações da cultura de <i>S. mutans</i> sobre a candidose bucal em modelo de camundongo imunossuprimido	33
3.6.1 Animais experimentais.....	33
3.6.2 Verificação de colonização natural por <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal dos camundongos	34

3.6.3	Imunossupressão e administração de tetraciclina	34
3.6.4	Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i>	35
3.6.5	Inoculação da suspensão de <i>C. albicans</i> na cavidade bucal dos camundongos e tratamento com extrato bruto e frações SM-F1 e SM-F2 da cultura de <i>S. mutans</i>	35
3.6.6	Recuperação de <i>C. albicans</i> da cavidade bucal dos camundongos.....	36
3.6.7	Eutanásia dos animais.....	36
3.6.8	Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos	37
3.6.9	Análise microscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos	37
3.7	Análise estatística	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1	Identificação das substâncias produzidas por <i>S. mutans</i>.....	39
4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i> sobre <i>C. albicans</i>.....	45
4.3	Efeitos do extrato bruto e frações da cultura de <i>S. mutans</i> sobre a candidose experimental no modelo de <i>Galleria mellonella</i>.....	45
4.3.1	Determinação da curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i>	45
4.3.2	Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL.....	49
4.3.3	Densidade hemocitária	52
4.4	Efeitos do extrato bruto e frações SM-F1 e SM-F2 da cultura de <i>S. mutans</i> sobre a candidose bucal em modelo de camundongo imunossuprimido	54
4.4.1	Recuperação de <i>Candida</i> da cavidade bucal dos camundongos	54
4.4.2	Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos	56
4.4.3	Análise microscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos	61
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE	87
	ANEXO	97

Santos JD. Atividade antifúngica do extrato bruto e frações de *Streptococcus mutans* sobre *Candida albicans* em modelos de estudo *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp); Instituto de Ciência e Tecnologia, 2018.

RESUMO

Estudos realizados *in vitro* tem demonstrado que *Streptococcus mutans* podem produzir metabólitos capazes de inibir *Candida albicans*, tornando interessante a identificação e desenvolvimento de novas substâncias para o tratamento da candidose bucal. Assim, o objetivo desse estudo foi extrair, fracionar e identificar as substâncias produzidas por *S. mutans* e avaliar seus efeitos sobre a patogenicidade de *C. albicans* e na resposta imunológica em modelos de estudo *in vivo*. As substâncias do sobrenadante da cultura de *S. mutans* foram extraídas com acetato de etila e posteriormente fracionadas em coluna de sílica derivatizada C-18 (150 g, $\Phi = 3,5$ cm) utilizando diferentes soluções de MeOH:H₂O (36:64, 49:51, 60:40, 76:24, 100:0) como eluente, obtendo cinco diferentes frações (SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4 e SM-F5). A identificação das substâncias contidas no extrato bruto e frações foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram testados os efeitos do extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre a candidose experimental induzida em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* e em camundongos imunossuprimidos. Para a escolha da concentração a ser testada nos modelos *in vivo* foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto e frações sobre *C. albicans*. No modelo de infecção experimental com *G. mellonella*, os efeitos do extrato e frações foram analisados pelos testes de curva de sobrevivência, quantificação de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa e determinação da densidade hemocitária das larvas de *G. mellonella*. O extrato, assim como as frações com melhores resultados em modelo de invertebrado foram selecionados para o estudo de candidose bucal em camundongos. Nesse modelo experimental, o desenvolvimento de candidose foi avaliado pelos testes de recuperação e determinação de UFC/mL de *C. albicans* da cavidade bucal, análise macroscópica e microscópica do dorso da língua. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Programa Graph Pad Prism 5.0, com nível de significância de 5%. Na determinação da concentração inibitória mínima, apenas o extrato bruto e a fração SM-F2 demonstraram efeito sobre *C. albicans*, sendo 10 mg/mL e 15mg/mL, respectivamente. No modelo de *G. mellonella* não houve aumento da sobrevivência das larvas com a utilização profilática do extrato, ocorrendo 100% de morte nas primeiras 24 h em ambos os grupos com infecção. No entanto, ao realizarmos o tratamento pós-infecção com o extrato bruto houve um aumento da sobrevivência em 18,75 a 25%. Como não houve efeito profilático para o extrato bruto, as frações foram administradas apenas terapêuticamente, verificando-se aumento da sobrevivência das larvas com as frações SM-F1 e SM-F2. Na contagem de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa das larvas, foi verificada diferença estatisticamente significativa apenas com o extrato bruto e fração SM-F2 após 12 h de infecção. Em relação a densidade hemocitária, os grupos tratados com extrato bruto e frações (SM-F1 e SM-F2) apresentaram maior número de hemócitos circulantes na hemolinfa em relação ao

grupo apenas infectado com *C. albicans*. Portanto, as frações SM-F1 e SM-F2 foram escolhidas para os testes em camundongos. Nesse modelo de estudo, verificou-se que o extrato bruto, SM-1 e SM-F2 foram capazes de reduzir significamente o número de UFC/mL de *Candida* na cavidade bucal e as lesões de candidose no dorso da língua, sendo esses efeitos mais proeminentes para SM-F2. Assim, concluiu-se que as frações SM-F1 e SM-F2 do extrato de *S. mutans* contêm substâncias antifúngicas com ação terapêutica sobre a candidose experimental, podendo ser alvos de novas estratégias terapêuticas para a candidose bucal.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. Candidose experimental. *Galleria mellonella*. Camundongos imunossuprimidos.

Santos JD. Antifungal activity of crude extract and fractions of Streptococcus mutans on Candida albicans in models of in vivo study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

In vitro studies have shown that Streptococcus mutans can produce metabolites capable of inhibiting Candida albicans, becoming interesting the identification and development of new substances for the treatment of oral candidiasis. Thus, the objective of this study was to extract, fractionate and identify the substances produced by S. mutans and evaluate their effects on the pathogenicity of C. albicans and on the immune response in in vivo study models. Substances from the S. mutans culture supernatant were extracted with ethyl acetate and subsequently fractionated on a C-18 derivatized silica column (150 g, $\Phi = 3.5$ cm) using different solutions of MeOH:H₂O (36:64, 49:51, 60:40, 76:24, 100:0) as eluent, obtaining five different fractions (SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4 and SM-F5). The identification of the substances contained in the crude extract and fractions was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The crude extract products and the fractions of the supernatant of the S. mutans culture were assessed on experimental candidiasis induced in invertebrate model of Galleria mellonella and in immunosuppressed mice. For a choice of the concentration to be tested in the in vivo models, a determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the crude extract and fractions on C. albicans was performed. In the model of experimental infection with G. mellonella, the effects of extract and fractions were analyzed by the survival curve test, quantification of CFU/mL of C. albicans in hemolymph and determination of haemocyte density of G. mellonella larvae. The extract, as well as fractions with better results in invertebrate model were selected for the study of oral candidiasis in mice. In this experimental model, the development of candidiasis was evaluated by the tests of recovery and determination of CFU/mL of C. albicans from the mice's oral cavity, macroscopic and microscopic examination of the tongue dorsum. The data obtained were statistically analyzed by Graph Pad Prism 5.0, with a significance level of 5%. In the determination of the minimal inhibitory concentration, only the crude extract and the SM-F2 fraction showed effect on C. albicans, with 10 mg/mL and 15 mg/mL, respectively. In the model of G. mellonella there was no increase in the larvae survival with the prophylactic use of the extract, occurring 100% of death in the first 24 h in both groups with infection. However, when we performed the post infection treatment with the crude extract there was an increase in survival from 18.75 to 25%. As there was no prophylactic effect for the crude extract, the fractions were administered only therapeutically, verifying increased survival of the larvae with the SM-F1 and SM-F2 fraction. In the CFU/mL count of C. albicans on larval hemolymph, a statistically significant difference was observed only with crude extract and SM-F2 fraction after 12 h of infection. In relation to hemocyte density, the groups treated with crude extract and fractions (SM-F1 and SM-F2) had a higher number of hemocytes circulating in the hemolymph compared to the group only infected with C. albicans. Therefore, the fractions SM-F1 and SM-F2 were chosen for the tests in mice. In this study model, it was verified that the crude extract, SM-F1 and SM-F2 were able to significantly reduce the number of

CFU/mL of Candida in oral cavity and lesions of candidiasis of the tongue dorsum, these effects were more prominent for SM-F2. Thus, it was concluded that the SM-F1 and SM-F2 fractions of the S. mutans extract contain antifungal substances with therapeutic action on experimental candidiasis, being able to be targets of new therapeutic strategies for oral candidiasis.

Keywords: Streptococcus mutans. Candida albicans. Experimental candidiasis. Galleria mellonella. Immunocompromised mice.

1 INTRODUÇÃO

Candida spp. são fungos comensais que colonizam indivíduos saudáveis, no entanto, em condições específicas, se tornam patogênicos e podem causar infecções sistêmicas superficiais e graves. O aumento das infecções por *Candida* tem acompanhado os avanços na medicina, como os procedimentos invasivos, o uso de drogas imunossupressoras para transplantes de órgãos e a administração frequente de antibióticos de amplo espectro (Wong et al., 2016). *Candida albicans* representa a espécie mais patogênica do gênero *Candida*, e este fato está diretamente correlacionado com seus fatores de virulência, como a formação de biofilme. Nos biofilmes, a matriz extracelular e o microambiente formado pelas comunidades microbianas propiciam uma elevada resistência dos fungos às moléculas de defesa do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (Borghini et al., 2014). Katragkou et al. (2010) verificaram que o biofilme pode prejudicar a resposta imunológica do hospedeiro por constituir uma barreira de difusão para fagócitos e citocinas, levando a persistência da infecção.

C. albicans pode ser encontrada em diferentes morfologias, como células leveduriformes ou filamentosas (Shapiro et al., 2011), o crescimento filamentoso é de particular interesse para a formação de biofilmes e para a patogênese do fungo (Woolford et al., 2017). As formas filamentosas, tais como pseudo-hifas e hifas, medeiam a adesão dos fungos às células e tecidos epiteliais, promovendo a invasão e danos subsequentes ao hospedeiro (Sudbery et al., 2004, Laprade et al., 2017). A capacidade de filamentação também faz parte da estratégia da levedura para escapar dos fagócitos e vencer o sistema imunológico do hospedeiro (McKenzie et al., 2010). Atualmente, há um claro aumento na taxa de mortalidade causada por esse fungo. Devido à algumas semelhanças entre células humanas e fúngicas, existem menos antifúngicos disponíveis do que medicamentos antibacterianos. As referidas questões levam a uma necessidade urgente de novas moléculas que possam agir sobre biofilmes de *C. albicans* e elevar o arsenal de agentes antifúngicos em caso de resistência (Leroy et al., 2016).

Além de causar candidose bucal, *C. albicans* pode provocar várias doenças polimicrobianas devido à sua capacidade em formar biofilmes multi-espécies

(Bamford et al., 2009; Dutton et al., 2014; Barua et al., 2017). Entre as infecções bucais, sabe-se que a estomatite protética é provocada por espécies de *Candida* associadas à diferentes bactérias, incluindo *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella*. A queilite angular também é uma infecção oral de etiologia mista, na qual *C. albicans* está associada à *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*. Na periodontite, *Candida* coexiste com outros micro-organismos do biofilme dentário, como *Staphylococcus*, bacilos entéricos, *Pseudomonas* e vários micro-organismos anaeróbios (Thein et al., 2009). *C. albicans* também é encontrada no biofilme supragengival, juntamente com *S. mutans*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Filoche et al., 2010), apresentando participação no desenvolvimento da cárie dentária (Klinke et al., 2011; Gregoire et al., 2011).

Tem sido relatado que as interações entre os micro-organismos no biofilme podem ser sinérgicas, neutras ou antagônicas (Peleg et al., 2010, Stacy et al., 2014), portanto o tipo de interações ecológicas estabelecidas entre *C. albicans* e *S. mutans* tem sido objeto de vários estudos (Jaroz et al., 2009; Falsetta et al., 2014; Gregoire et al., 2011; Liu et al., 2017).

Streptococcus mutans apresentam capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares (glucanos) a partir da sacarose pelas enzimas denominada glicosiltransferase (GTF), que sintetiza glucanos extracelulares (Nagasawa et al., 2017). Alguns estudos demonstraram que a formação de polissacarídeos por *S. mutans* pode favorecer o crescimento de *C. albicans*. Análises de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes mistos, formados por *S. mutans* e *C. albicans*, revelaram imagens de produtos extracelulares entre as células de leveduras e cocos, sugerindo que glucanos produzidos localmente desempenham um papel importante na mediação da co-adesão entre esses micro-organismos (Pereira-Cenci et al., 2008; Metwalli et al., 2013). Além disso, foi determinado que todas as três enzimas glicosiltransferases produzidas por *S. mutans* possuem capacidade de se ligar às superfícies das células de *C. albicans*, sendo a enzima GtfB a que apresenta maior grau de afinidade pelo fungo (Bowen e Koo, 2011). De acordo com Falsetta et al. (2014), na presença da sacarose, as GTFs adsorvidas nas células de *C. albicans* produzem grandes quantidades de glucanos na superfície fúngica. Estes glucanos formados *in situ* fornecem sítios de ligação para *S. mutans*, enquanto que

simultaneamente aumentam a adesão fúngica às superfícies da hidroxiapatita. Esses estudos demonstraram que *S. mutans* estabelecem relações de mutualismo com *C. albicans* e que biofilmes formados por essas duas espécies podem aumentar a severidade das infecções clínicas, como a cárie dentária.

Por outro lado, durante a colonização de *S. mutans* na cavidade bucal, um dos principais mecanismos de virulência é a liberação de substâncias antimicrobianas, denominadas mutacinas. Essas substâncias interferem na invasão e proliferação de outros micro-organismos do biofilme, estabelecendo relações competitivas que conferem vantagem ecológica para as células de *S. mutans* (Kreth et al., 2006; Kamiya et al., 2011).

Pereira-Cenci et al. (2008) analisaram a co-cultura de *C. albicans* e *S. mutans* em modelos de biofilmes *in vitro* sobre discos de hidroxiapatita. Foi demonstrado que as células de *S. mutans* aumentaram o crescimento de *C. albicans* por estimular a co-adesão, simultaneamente, das duas espécies. Entretanto, as células de *S. mutans* suprimiram a formação de hifas por *C. albicans*, sugerindo que as interações entre essas espécies podem ser mediadas por moléculas de sinalização.

Algumas moléculas de sinalização, envolvidas no *quorum sensing* bacteriano com capacidade de suprimir a filamentação de *C. albicans*, já foram descritas em bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* (Hogan et al., 2004). A molécula N-3-oxo-C₁₂ homoserina lactona (HSL) produzida por *P. aeruginosa* inibiu completamente a formação de hifas por *C. albicans*, sem alterar a taxa de crescimento fúngico das leveduras. Embora muitas bactérias Gram-negativas produzam moléculas HSLs com grupos acilas de cadeias mais curtas (por exemplo, C₄ - HSL), a inibição da formação de hifa por *C. albicans* é causada especificamente por moléculas HSL de cadeia longa. Além disso, moléculas não-HSL, tais como o dodecanol e o farnesol, também são capazes de inibir a formação de hifas de *C. albicans* (Davis-Hanna et al., 2008).

As moléculas de sinalização produzidas por *S. mutans* também parecem inibir a filamentação de *C. albicans*. Jarosz et al. (2009) observaram que *S. mutans* diminuiu a formação de tubos germinativos por *C. albicans* em co-culturas, mesmo quando essas bactérias foram fisicamente separadas de *C. albicans*, indicando que *S. mutans* secretam substâncias no meio capazes de inibir sua filamentação. Joyner

et al. (2010) atribuíram os efeitos inibitórios na formação de hifa a um peptídeo natural produzido por *S. mutans*, que recebeu o nome de *mutanobactin*.

Como citado nos estudos anteriores, essas interações entre *S. mutans* e *C. albicans* tem sido bastante investigadas em modelos de estudo *in vitro*, entretanto os efeitos das substâncias produzidas por *S. mutans* sobre *C. albicans* não foram testados em estudos *in vivo*, como por exemplo, em modelos de candidose experimental. Nas últimas décadas, modelos *in vivo* de infecção experimental foram desenvolvidos em animais invertebrados. Muitos estudos demonstraram que embora os invertebrados estejam separados dos mamíferos por milhões de anos de evolução, muitos aspectos do sistema imune inato foram conservados entre essas espécies (Arvanitis et al., 2013). Os modelos de invertebrados demonstram inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo na criação, facilidade de manuseio, rapidez na obtenção de resultados, além de não apresentarem restrições éticas. Entre os vários modelos de infecção experimental em invertebrados podemos citar a larva da mariposa *Galleria mellonella*, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e o nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Mylonakis et al., 2008; Fuchs et al., 2010).

G. mellonella tem sido utilizada com sucesso como modelo para a patogênese de *Candida* porque apresenta tamanho suficiente (aproximadamente 5 cm de comprimento) para injeção de um inóculo padronizado de *C. albicans* ou de substâncias com ação antifúngica. Além disso, apresentam uma resposta inata bem desenvolvida, constituída por componentes humorais e celulares. A resposta humoral consiste em peptídeos antimicrobianos (AMPs), como as defensinas, que são liberados por algumas células e órgãos internos de *G. mellonella* com finalidade de destruir estruturas das células bacterianas e fúngicas que penetram na hemolinfa. Os mecanismos celulares compreendem a fagocitose e a nodulação (Arvanitis et al., 2013). Mais especificamente, a resposta imune celular de *G. mellonella* é constituída por seis tipos de hemócitos (prohemócitos, coagulócitos, esferulócitos, oenocitóides, plasmócitos e granulócitos) e seu principal mecanismo contra patógenos é a fagocitose, mecanismo no qual os hemócitos circulantes na hemolinfa do inseto reconhecem, engolfam e matam os patógenos invasores. No entanto, quando o número de patógenos excede um limiar ocorre a nodulação, processo em que os

hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizar e remover os patógenos da circulação (Vilcinskas et al., 2010).

A grande vantagem do uso de invertebrados como modelo de infecção experimental é a possibilidade da realização de estudos em grande escala, que envolvem um número elevado de animais por grupo experimental. Assim, o modelo de *G. mellonella* serve como triagem para o estudo em animais vertebrados, atendendo às questões éticas e legais para a redução do uso de animais, como ratos e camundongos, em pesquisa científica.

Uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que *S. mutans* produzem substâncias capazes de inibir a filamentação de *C. albicans*, esse trabalho teve como objetivo extrair, fracionar e identificar as substâncias produzidos por *S. mutans*, testando seus efeitos sobre a patogenicidade de *C. albicans* e a resposta imunológica em modelos de *G. mellonella*. O extrato e as frações obtidas com maior atividade antimicrobiana foram selecionados para testes em modelo de candidose bucal em camundongos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antimicrobianos e imunomodulatórios das substâncias produzidas por *S. mutans* no tratamento da candidose em modelos de estudo *in vivo*.

2.1.1 Objetivos específicos

- Extrair, fracionar e identificar as substâncias presentes no sobrenadante da cultura de *Streptococcus mutans*;
- Verificar os efeitos das substâncias de *S. mutans* sobre a patogenicidade de *C. albicans* na candidose experimental em *Galleria mellonella*, por meio da análise da curva de sobrevivência, quantificação de UFC/mL de *C. albicans* da hemolinfa e determinação da densidade hemocitária em larvas de *G. mellonella*;
- Selecionar as substâncias com melhor efeito antimicrobiano sobre a candidose experimental no modelo de *Galleria mellonella*, para avaliar sua ação na candidose bucal em modelo de camundongos imunossuprimidos, por meio da recuperação de UFC/ml de *C. albicans* da cavidade bucal, análise macroscópica e microscópica do dorso da língua.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Para realização desse trabalho foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans* (UA 159) e de *Candida albicans* (ATCC 18804), mantidas em freezer a -80 °C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *S. mutans* foi cultivada em ágar Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37 °C em microaerofilia (5% de CO₂) e a cepa de *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) por 48 h a 37 °C.

3.2 Comitê de Ética

Esse trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/UNESP do Campus de São José dos Campos, cuja aprovação ocorreu em 13 de maio de 2016 sob protocolo nº 005/2016-CEUA-ICT-UNESP (ANEXO A). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei 11.794, de 8 de Outubro de 2008.

3.3 Preparo do extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

3.3.1 Preparo do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

O preparo do sobrenadante de *S. mutans* foi realizado de acordo com Barbosa et al. (2016). A cepa foi incubada em caldo BHI suplementado com 5% de sacarose a 37 °C por 24 h, sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após este período, as células microbianas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 398 nm e densidade óptica de 0,560, obtendo-se uma concentração de 10⁷ células/mL de *S. mutans*. Um volume de 1 mL da suspensão padronizada foi transferido para um tubo falcon contendo 6 mL de caldo BHI e incubado novamente a 37 °C por 4 h, em estufa bacteriológica sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após este período, o caldo foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min e filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA).

3.3.2 Extração e fracionamento do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Os compostos do sobrenadante filtrado da cultura de *S. mutans* foram extraídos (extrato bruto do sobrenadante) e posteriormente fracionados. A extração foi realizada em parceria com o Instituto de Química da Unesp, campus de Araraquara, com colaboração da Profa. Dulce Helena Siqueira Silva, integrante do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).

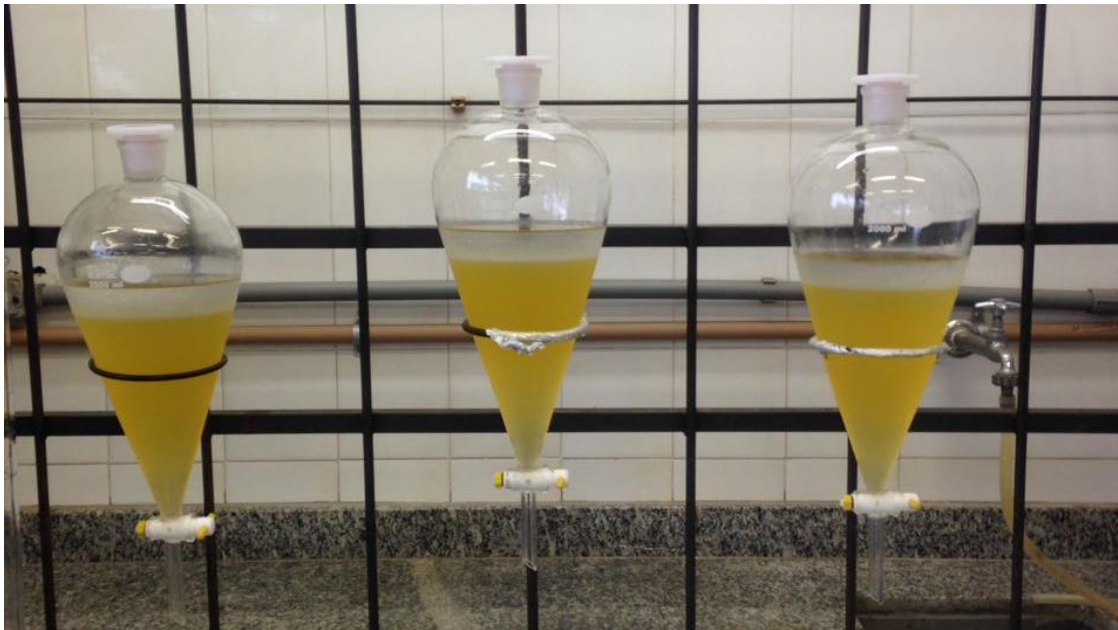
O sobrenadante foi submetido à extração com acetato de etila (3 vezes) (Figura 1), em seguida o solvente orgânico foi removido sob vácuo em evaporador

rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo (D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments) e refrigeração a uma temperatura inferior a 3 °C (Marconi BTC-9090) (Figura 2). A seguir, o extrato foi liofilizado e pesado, obtendo-se o extrato bruto.

A primeira etapa para obtenção do extrato bruto do sobrenadante da cultura de *S. mutans* foi realizada em escala reduzida, obtendo-se dois extratos: um proveniente da fase aquosa (fase da água - caldo BHI) e outro proveniente da fase orgânica (solvente - fase ativa). O extrato obtido da fase aquosa foi testado para descartar a possibilidade de haver algum efeito sobre *C. albicans*, como não houve ação sobre o fungo, nas demais extrações ele foi descartado. A massa obtida na extração de 375 mL de sobrenadante da cultura de *S. mutans* foi aproximadamente 2 g de extrato aquoso e 51 mg de extrato orgânico. Outra etapa de extração foi realizada, porém em maior escala. Neste segundo processo foi utilizado 500 mL do sobrenadante, e a massa de extrato bruto orgânico obtida foi 110 mg. Mais duas extrações em escala ampliada foram realizadas para o fracionamento do extrato bruto do sobrenadante da cultura de *S. mutans* (Quadro 1). As frações SM-F3 e SM-F4 não foram utilizadas nos testes posteriores, pois não havia quantidade suficiente para realização dos ensaios experimentais.

A partir do perfil obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) do extrato bruto (Apêndice A, Figuras 3-8), optou-se por submetê-lo ao fracionamento em coluna de sílica derivatizada C-18 (150 g, $\Phi = 3,5$ cm) com diferentes soluções de MeOH:H₂O como eluente (Figura 9) determinadas a partir do cromatograma do perfil, obtendo 5 frações (Quadro 2).

Figura 1 - Extração do sobrenadante da cultura de *S. mutans* com acetato de etila



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 - Remoção do solvente orgânico sob vácuo em evaporador rotatório da Buchi R-114



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1 - Rendimentos obtidos na extração do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Sobrenadante	Massas (mg)			
	375 mL	500 mL	6400 mL	6000 mL
Extrato Bruto (SM-EB)	51	110	205,9	356,6
Fração 1 (SM-F1)	-	-	969,3	927,6
Fração 2 (SM-F2)	-	-	210	281,8
Fração 3 (SM-F3)	-	-	22,7	30,7
Fração 4 (SM-F4)	-	-	6	4,8
Fração 5 (SM-F5)	-	-	397,2	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Fracionamento do sobrenadante da cultura de *S. mutans*



Legenda: Fracionamento do sobrenadante da cultura de *S. mutans* utilizando coluna de sílica derivada C-18 (150 g, $\Phi = 3,5$ cm) com diferentes soluções de MeOH:H₂O (36:64, 49:51, 60:40, 76:24, 100:0) como eluente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Fracionamento do extrato bruto em coluna de sílica derivatizada C-18 com diferentes soluções de MeOH:H₂O como eluente

Fração	Proporção de MeOH:H ₂ O
SM-F1	36:64
SM-F2	49:51
SM-F3	60:40
SM-F4	76:24
SM-F5	100:0

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.3 Identificação das substâncias presentes no extrato bruto e frações obtidas do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Para a identificação das substâncias do extrato bruto e das frações obtidas foi realizada cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM, Shimadzu, modelo GC-MS-QP2020) com autoinjeter AOC-20i (Apêndice B, Figuras 10-16). A coluna utilizada para as análises foi Supelco RTX-5MS (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

Condições Cromatográficas:

Temperatura do injetor: 260 °C.

Modo de injeção: split

Temperatura do detector: 260 °C

Vazão do gás de arraste (He): 1,0 mL min⁻¹

Coluna: 80 °C (3 min) $\xrightarrow{3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 260 °C (10 min)

O espectrômetro de massas utilizado nas análises de CG-EM é equipado com fonte de ionização por impacto eletrônico (EI), ajustada em 70 eV e uma faixa de massas de aquisição de m/z 35-700. Para garantir uma maior estabilidade térmica e maior volatilidade dos constituintes, bem como uma melhor resolução cromatográfica (Pellatti, Benvenuti, 2007) foi realizada uma etapa de derivação (sililação), durante o preparo das amostras. Sendo assim, 5 mg de SM-EB e SM-F1, SM-F2 e o controle foram solubilizadas em 200 µL de piridina, em seguida, foram adicionados 200 µL de *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida (MSTFA - Sigma).

As amostras foram mantidas a 37° C por 30 min. Após 24 h de repouso a 5 °C (geladeira), as mesmas foram filtradas em membranas PTFE (0,22 µm) e foram analisadas (Tomaz, 2011).

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato e frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre *C. albicans*

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método de microdiluição em caldo realizado em placas de 96 poços. Para isso, a cepa de *C. albicans* foi cultivada em caldo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose) e incubadas a 30° C durante 16 h. Após, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As células foram padronizadas a 1×10^3 células/mL em meio RPMI utilizando hemocítômetro. O extrato e frações foram diluídos e adicionados ao meio RPMI com 2 vezes a concentração final, as concentrações testadas foram de 1 a 15 mg/mL. Cada poço teve um volume final de 100 µl (50 µl do extrato/fração + 50 µl da suspensão de *Candida albicans*). A placa foi incubada a 35° C por 48 h, a constatação da CIM foi feita a olho nu e determinada no poço onde não houve turvação do meio após 24 h de incubação. Após as 48 h, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 595 nm.

3.5 Efeitos do extrato bruto e frações da cultura de *S. mutans* sobre a candidose experimental no modelo de *Galleria mellonella*

3.5.1 Grupos experimentais

Para o estudo neste modelo invertebrado foram utilizadas as metodologias descritas por Mylonakis et al. (2005) e Fuchs et al. (2010). Os ensaios experimentais

e o número de larvas utilizadas por experimento estão representados abaixo no Quadro 3.

Quadro 3 - Grupos experimentais e número de larvas de *G. mellonella* por experimento

Grupos Experimentais	<i>Galleria mellonella</i>		
	Curva de sobrevivência	Contagem de UFC/mL	Densidade hemocitária
Controle <i>C. albicans</i> e PBS	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e extrato bruto 10 mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e extrato bruto 15 mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e extrato bruto 10 mg/mL (Profilático)	16	-	-
Interação <i>C. albicans</i> e extrato bruto 15 mg/mL (Profilático)	16	-	-
Interação <i>C. albicans</i> e fração SM-F1 15 mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e fração SM-F1 30 mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e fração SM-F2 15mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e fração SM-F2 30mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e fração SM-F5 15 mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
Interação <i>C. albicans</i> e fração SM-F5 30 mg/mL (Terapêutico)	16	60	18
PBS apenas	16	-	18
Sem injeção	16	-	-
TOTAL	208	540	180

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram utilizadas no total 928 larvas de *G. mellonella* (Vanderhorst Wholesale, St. Marys, OH, EUA) em estágio final da fase de larva com peso corporal entre 250 a 300 mg na Universidade de Brown (EUA). Todas as larvas selecionadas apresentavam cor clara e sem manchas e/ou pigmentos escuros em sua cutícula, o que poderia indicar o comprometimento do animal por algum processo infeccioso, influenciando no resultado do experimento. As larvas foram armazenadas no escuro

e utilizadas em um prazo máximo de 7 dias após recebimento. Como não obtivemos quantidades suficientes das frações SM-F3 e SM-F4 para a realização dos testes em *G. mellonella* foi avaliado o efeito apenas das frações SM-F1, SM-F2 e SM-F5.

3.5.2 Preparo da suspensão padronizada de *Candida albicans*

C. albicans foi cultivada a 30 °C com agitação por 18 h em caldo YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose). A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuspenso em PBS e homogeneizado em agitador de tubos (vortex) por 30 s. Esta lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. As densidades celulares de *C. albicans* foram ajustadas em 10^8 células/mL em câmara de Neubauer (Laboroptik GMBH, Bad Homburg, Alemanha)

3.5.3 Injeção dos micro-organismos em *G. mellonella*

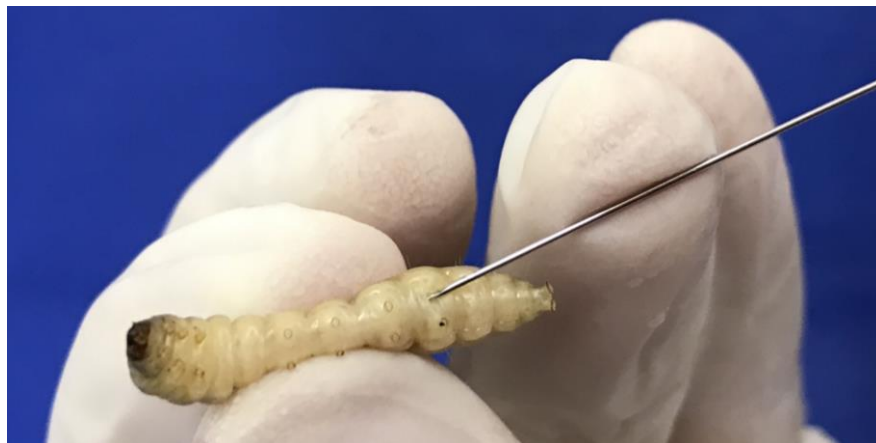
Um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última prolegue esquerda (Figura 17). Foi inoculado também 10 µL do extrato bruto ou frações do extrato bruto da cultura de *S. mutans* na prolegue direita, que foram subdivididos em grupo profilático e terapêutico. No grupo profilático, o extrato bruto foi injetado na última prolegue direita da larva 24 h antes da inoculação das células de *C. albicans*, como não houve resultados favoráveis a forma profilática não foi testada para as frações. No grupo terapêutico, o extrato bruto e frações foram injetadas na última prolegue direita da larva 30 min depois da inoculação das células de *C. albicans*. Para o grupo controle de *C. albicans* foi inoculado 10 µL da suspensão do micro-organismo na prolegue esquerda e o mesmo volume de PBS na prolegue direita.

Para cada ensaio, também foi incluído mais dois grupos controles, o primeiro recebeu o mesmo número de injeções recebidas pelos grupos experimentais. Cada

injeção deste grupo controle continha 10 µL de solução fisiológica (PBS) e o objetivo foi avaliar se mortes de *G. mellonella* ocorreram em virtude da injúria traumática causada pelas injeções ou pela técnica de manipulação do animal, ou seja, o grupo controlou a técnica utilizada pelo operador. O segundo grupo foi composto por larvas que não receberam injeção alguma. A finalidade deste último grupo foi controlar a remessa de *G. mellonella* utilizada no experimento. Em casos onde ao menos em um dos grupos controle houve 2 larvas mortas, o ensaio foi desconsiderado e um novo refeito.

Seringas Hamilton com capacidade de 10 µL (Hamilton Inc, EUA) foram utilizadas para as injeções. Antes da inoculação, as seringas utilizadas para as injeções foram esterilizadas com ácido peracético (Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, *Alemanha*) de acordo com as instruções do fabricante. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foram executadas a cada 5 injeções. Para esta limpeza a seringa foi lavada em uma sequência de 4 tubos de ensaio contendo respectivamente: 1º) hipoclorito de sódio, 2º) álcool absoluto, 3º) água destilada estéril e 4º) PBS estéril. Em cada tubo, a agulha foi mergulhada e 7 movimentos no êmbolo da seringa para cima e para baixo foram executados. Após a injeção, as larvas foram armazenadas em recipientes plásticos e mantidas no escuro em estufa a 37 °C.

Figura 17 - Demonstração da injeção de micro-organismo em *G. mellonella* utilizando seringa de Hamilton



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.4 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Após as inoculações, as larvas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A morte de todas as larvas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento.

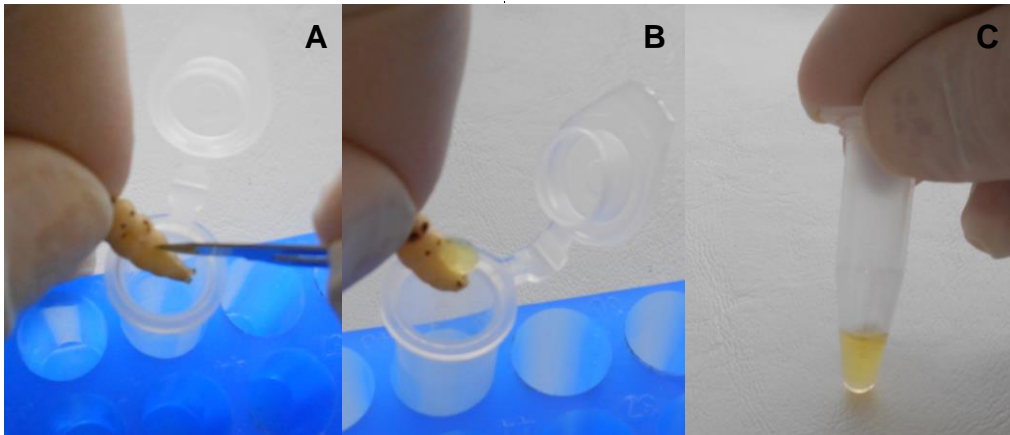
3.5.5 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL

Para quantificar a presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella*, foram realizados experimentos com a eutanásia de larvas nos tempos de 0, 4, 8 e 12 h após a infecção, nos seguintes grupos experimentais: Interação extrato bruto de *S. mutans* e *C. albicans*, Interação frações de *S. mutans* e *C. albicans* e controle de *C. albicans*.

Para cada grupo e tempo foi utilizado um *pool* de 5 larvas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo foram utilizadas 60 larvas.

Em cada tempo, as larvas foram cortadas com bisturi no sentido céfalo caudal e espremidas para retirada da hemolinfa, que foi colocada em um *ependorf* (Figura 18). A partir do *pool* da hemolinfa das larvas, foram feitas diluições seriadas e sementeiras em placas de *Petri* contendo meio de cultura seletivo para *C. albicans*, ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol por mL de meio (Vixmicina, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

Figura 18 - Técnica para a obtenção da hemolinfa de *G. mellonella*



Legenda: A) larva posicionada para retirada da hemolinfa. Incisão feita logo abaixo da última prolegue esquerda e posteriormente seguindo a linha mediana da larva até sua região caudal; B) hemolinfa sendo retirada após a incisão; C) tubo eppendorf com hemolinfa.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.6 Densidade hemocitária

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis et al. (2005). Para cada grupo experimental 3 larvas foram infectadas conforme descrito no item anterior e incubadas a 37 °C durante 4 e 24 h. Para a coleta da hemolinfa as larvas foram imobilizadas em placa de Petri gelada por cerca de 20 min, em seguida foram cortadas com bisturi na parte ventral no sentido céfalocaudal e espremidas para a retirada da hemolinfa que foi coletada em microtubos.

Para cada grupo foi utilizado um *pool* de 5 larvas para coleta de hemolinfa. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo foram utilizadas 15 larvas. A seguir, 20 µL de cada hemolinfa coletada foram diluídos em 180 µL de IPS em microtubo gelado. Os hemócitos foram identificados com base na morfologia celular e quantificados usando um hemocitômetro.

3.6 Efeitos do extrato bruto e frações da cultura de *S. mutans* sobre a candidose bucal em modelo de camundongo imunossuprimido

Foram selecionadas duas frações (SM-F1 e SM-F2) da cultura de *S. mutans* que obtiveram melhores resultados sobre o modelo de *G. mellonella* para a realização do estudo de candidose experimental em camundongos.

3.6.1 Animais experimentais

Foram utilizados 27 camundongos machos Swiss provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu/UNESP. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma: infecção por *C. albicans* (n = 5), infecção por *C. albicans* e tratamento com sobrenadante de *S. mutans* (n = 5), infecção por *C. albicans* e tratamento com extrato bruto do sobrenadante de *S. mutans* (n = 5), infecção por *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F1 do extrato bruto de *S. mutans* (n = 5), infecção por *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F2 do extrato bruto de *S. mutans* (n = 5) e sem infecção (n = 2). Nesse modelo foi acrescentado o grupo tratado com o sobrenadante, já que no trabalho anterior que nos baseamos para a realização do presente estudo (Barbosa et al., 2016), foi realizado ensaios experimentais utilizando apenas o sobrenadante no modelo de *G. mellonella*.

A linha do tempo com a distribuição dos dias e seus respectivos experimentos para a indução da candidose bucal em camundongos está representada no Quadro 4.

Quadro 4 - Linha do tempo com a distribuição dos dias e seus respectivos experimentos

Dias	Experimento
1º dia	1ª imunossupressão
2º dia	Inoculação das suspensões de <i>Candida albicans</i>
3º dia	2ª imunossupressão
4º dia	Inoculação das suspensões de <i>Candida albicans</i>
5º dia	Tratamento
7º dia	Recuperação, eutanásia, análise macroscópica, preparo para análise histológica

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.2 Verificação de colonização natural por *Candida* spp. na cavidade bucal dos camundongos

Antes de iniciar a indução de candidose bucal por *C. albicans* foi verificada a colonização natural por leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de todos os animais. Para isto foi coletado, com o auxílio de um swab estéril, material de toda a cavidade bucal, principalmente do dorso da língua. O swab foi imediatamente semeado em placas com ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol por mL de meio (Vixmicina, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Foram utilizados somente animais com cultura negativa para *Candida* spp. na cavidade bucal.

3.6.3 Imunossupressão e administração de tetraciclina

Os animais foram imunossuprimidos com 2 injeções intraperitoneais de prednisolona (Depo-Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, Brasil), na dose de 100 mg/Kg de massa corporal, 1 dia antes de cada inoculação com *C. albicans*. Na

água de beber foi administrado cloridrato de tetraciclina (Terramicina, Pfizer) na concentração de 0,83 mg/mL, iniciando 1 dia antes da infecção e mantido até o final do experimento. A imunossupressão e administração de tetraciclina foram realizadas de acordo com o modelo experimental desenvolvido por Takakura et al. (2003) e descrito por Rossoni et al. (2015) com modificações.

3.6.4 Preparo da suspensão de *C. albicans*

A cepa de *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) a 37 °C por 24 h. O crescimento foi ressuspensão em PBS e centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido novamente. O sedimento foi ressuspensão em 6 mL de PBS e padronizado em 10⁹ células viáveis/mL em câmara de Neubauer (Laboroptik GMBH, Bad Homburg, Alemanha).

3.6.5 Inoculação da suspensão de *C. albicans* na cavidade bucal dos camundongos e tratamento com extrato bruto e frações SM-F1 e SM-F2 da cultura de *S. mutans*

Para a inoculação da suspensão de *C. albicans*, os animais foram sedados via intraperitoneal com injeções de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Os camundongos foram infectados com auxílio de um swab estéril (Absorve, Cral, São Paulo, SP, Brasil), previamente embebido na suspensão de *C. albicans*, padronizada em 10⁹ células/mL, que foi deixada por 30 min sobre o dorso da língua dos camundongos, um dia após cada imunossupressão. Para os grupos com tratamento, o sobrenadante, extrato e frações também foram inoculados na cavidade bucal dos animais com auxílio de uma pipeta um dia após a segunda inoculação de *Candida*. Foi inoculado 0,2 mL do sobrenadante e 30 mg do extrato e frações que foram

diluídos em 0,05 mL de PBS, sendo que o volume foi dividido em duas partes e inoculados a cada 15 min.

3.6.6 Recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos

Após 2 dias do tratamento, foram coletadas amostras do dorso da língua dos animais com swab, os quais foram imediatamente colocados em tubos de ensaio contendo 9,9 mL de PBS, e agitado durante 30 s, considerando-se que o swab absorve aproximadamente 0,1 mL da cavidade oral dos camundongos, essa diluição foi estimada como uma diluição inicial de 10^{-1} . Foram realizadas diluições seriadas e a seguir, 0,1 mL de cada diluição foi semeada em duplicata na superfície de placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) acrescido de 0,1 mg de cloranfenicol por mL de meio (Vixmicina, São Paulo, Brasil). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Foram contadas colônias típicas de *C. albicans* em placas que apresentaram de 30 a 300 colônias para a determinação de UFC/mL.

3.6.7 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada 2 dias após o tratamento. Esse procedimento foi realizado administrando-se dose excessiva de anestésico intramuscularmente com ketamina (100-150 mg/Kg) e xilazina (10-15 mg/Kg). Após anestesia, foi coletado material do dorso da língua para recuperação de *C. albicans* conforme descrito no item anterior. A seguir, as línguas foram removidas para a realização das análises macroscópica e microscópica.

3.6.8 Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

Durante a realização dos tratamentos experimentais e após a eutanásia dos animais, foram observadas lesões características de candidose pseudomembranosa no dorso da língua dos camundongos e foram atribuídos escores de 0-4 de acordo com as lesões: 0, normal; 1, placas brancas em menos de 20%; 2, placas brancas variando de 21-90%; 3, placas brancas em mais de 91%; 4, placa branca espessa como pseudomembranas em mais de 91% (Takakura et al. 2003 e Rossoni et al. 2015). As línguas retiradas foram observadas com o auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss), com aumento de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes.

3.6.9 Análise microscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

Para a análise microscópica das lesões, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 h e seccionadas em duas partes no sentido sagital. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes seriados de 5 µm de espessura, que foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A presença de candidose foi pesquisada em toda a superfície do dorso da língua e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com a presença de leveduras e hifas, localização e extensão das lesões e alterações dos tecidos envolvidos. A presença de leveduras e hifas foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por Junqueira et al. (2005), atribuindo-se os seguintes escores para os campos histológicos: 0, ausência de leveduras e hifas; 1, de 1 a 5; 2, de 6 a 15; 3, de 16 a 50; 4, mais de 50.

Foi realizada uma avaliação da intensidade das lesões teciduais e atribuição de escores à resposta inflamatória no tecido conjuntivo de acordo com Martins et al. (2011). Foram observadas as seguintes alterações teciduais no dorso da língua: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, excitose, espongiose, perda

das papilas filiformes, hiperqueratose, descamação, acantólise, perda da estratificação e formação de microabscessos intraepitelial. Para o infiltrado inflamatório crônico, foram atribuídos os seguintes escores: 0 (ausência de células inflamatórias), 1 (infiltrado inflamatório discreto), 2 (infiltrado inflamatório moderado) e 3 (infiltrado inflamatório acentuado).

3.7 Análise estatística

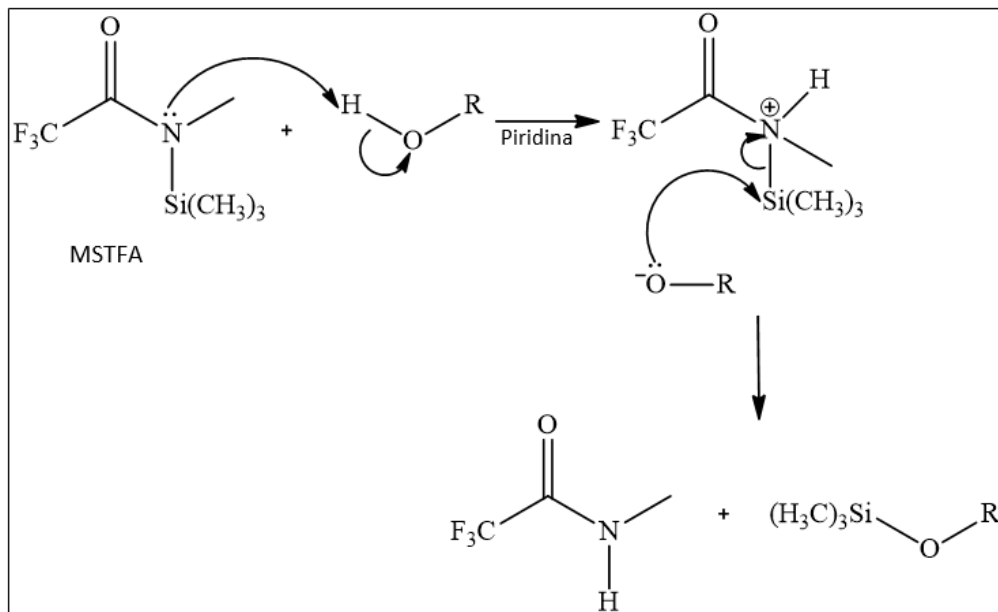
Para os experimentos de sobrevivência em *G. mellonella* foi realizada a curva de sobrevivência utilizando o método *Kaplan-Meier* e o nível de significância calculado através do teste *Log-rank (Mantel-Cox)*. A análise dos dados da contagem de UFC/mL de *Candida* presente na hemolinfa de *G. mellonella* e da recuperação dos camundongos foi avaliada pela Análise de Variância, Teste de Tukey ou *t* de Student. Para avaliação dos escores obtidos na análise macroscópica e histológica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todos os testes foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das substâncias produzidas por *S. mutans*

O extrato bruto (SM-EB) e as frações SM-F1 e SM-F2, bem como o controle (apenas caldo BHI), foram analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Durante o preparo das amostras foi realizada uma etapa de derivação (sililação), que consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupos $-OH$, $-SH$, $-NH$ e $-COOH$ dos metabólitos por grupos trimetilsilil (TMS) (Figura 19), de forma a obter-se derivados com menor polaridade, maior volatilidade e estabilidade térmica (Pellatti; Benvenuti, 2007).

Figura 19 - Mecanismo para a reação de sililação (exemplificada para um álcool)



As Figuras 10-16 (Apêndice B) apresentam os cromatogramas obtidos por CG-EM para SM-EB, SM-F1, SM-F2 em comparação com o cromatograma do controle (apenas o caldo, sem o crescimento de *S. mutans*).

Ao analisar os cromatogramas é possível verificar que o extrato de SM-EB e do controle apresentam picos com os mesmos tempos de retenção (T_R), sendo que alguns picos apresentam variações significativas de intensidade, como é o caso do pico em $T_R = 7,138$ min. Já a comparação dos cromatogramas da fração SM-F1 e do controle indicou a presença de picos em SM-F1 ($T_R = 53.123, 55.172, 55.457, 55.842, 56.229, 58.102$ min) diferentes daqueles observados no controle. Em SM-F2 foi possível verificar alguns picos com intensidades bem diferentes daquelas observadas para alguns picos do controle, como os picos em $T_R = 29.805, 42.460, 50.795, 52.832, 53.708, 56.405, 58.630$ min.

A partir dos resultados de CG-EM foi possível identificar os constituintes de SM-EB, SM-F1, SM-F2 e do controle (Figuras 13 a 16 – Apêndice B), por meio de análise e comparação dos espectros de massas com dados das bibliotecas Wiley7 e Nist através do software *GCMS solutions Ver. 2.5* (Tabelas 1-4).

Apesar do alto número de picos em todos os cromatogramas, foi possível apenas a identificação de alguns, já que a similaridade era muito baixa quando os mesmos eram comparados com possíveis substâncias descritas nas bases de dados. Não há um grande número de substâncias de extrato de micro-organismos que foram identificadas e inseridas nessas bases de dados, e ainda, há a possibilidade de algumas dessas substâncias serem inéditas, por isso não foi possível a identificação de um número maior de metabólitos.

Na análise do extrato bruto e fração SM-F2, foram encontradas 2 substâncias que diferiram do grupo o qual não foi realizado o crescimento de *S. mutans* (grupo controle). Já na fração SM-F1 havia 5 diferentes substâncias.

Tabela 1 - Identificação das substâncias presentes no controle por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
2	7,140	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	93%
5	13,105	Silane, trimethyl(2-phenylethoxy)-	93%
6	13,913	Benzoic acid trimethylsilyl ester	90%
7	15,621	Glycerol-tri-tms ether	93%
8	16,092	Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester	96%
10	18,131	Pyrimidine, 2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	92%
12	20,479	Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-	87%
13	21,092	Benzenepropanoic acid, trimethylsilyl ester	95%
29	27,589	4-Hydroxyphenylethanol, di-TMS	90%
59	39,957	Pyridine, 2-methyl-3-(trimethylsilyloxy)-4,5-bis-[(trimethylsilyloxy)methyl]-	94%
60	40,405	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	90%
71*	43,529	.beta.-D-Glucopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	96%
72	44,225	Xanthine-tri-tms	86%
73	44,327	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	91%
88	50,354	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	85%
93	53,678	9-Octadecenamide, (Z)-	92%
94	54,171	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	92%
105*	65,149	2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(phenylmethyl)-	85%
106	66,345	L-Tryptophan, N,1-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	86%

Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>; TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com os demais grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Identificação das substâncias presentes no extrato bruto por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
2	7,138	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	95%
4	13,102	Silane, trimethyl(2-phenylethoxy)-	93%
5	13,912	Benzoic acid trimethylsilyl ester	93%
6*	14,685	Octanoic acid, trimethylsilyl ester	91%
7	15,619	Glycerol-tri-tms ether	93%
8	16,088	Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester	97%
11	18,128	Pyrimidine, 2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	92%
13	20,478	Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-	90%
14	21,088	Benzenepropanoic acid, trimethylsilyl ester	95%
29	27,583	4-Hydroxyphenylethanol, di-TMS	91%
68	39,953	Pyridine, 2-methyl-3-(trimethylsilyloxy)-4,5-bis-[(trimethylsilyloxy)methyl]-	94%
69	40,435	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	90%
78	44,218	Xanthine-tri-tms	89%
79	44,317	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	90%
95	50,346	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	87%
101	53,677	9-Octadecenamide, (Z)-	93%
102	54,183	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	92%
104*	56,682	Uridine, 2',3',5'-tris-O-(trimethylsilyl)-	86%
117	66,338	L-Tryptophan, N,1-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	85%

Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>; TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Identificação das substâncias presentes na fração SM-F1 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
3	7,146	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	94%
5	13,922	Benzoic acid trimethylsilyl ester	93%
6	15,629	Glycerol-tri-tms ether	93%
7	16,096	Benzeneacetic acid, trimethylsilyl ester	98%
9*	18,058	Propanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	94%
10	18,137	Pyrimidine, 2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	92%
12*	20,128	(3R)-3-Methyl-1,4-bis(trimethylsilyl)piperazine-2,5-dione	93%
13	20,488	Silanamine, 1,1,1-trimethyl-N-(trimethylsilyl)-N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-	89%
14*	20,845	Pyrimidine, 5-methyl-2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	88%
15	21,099	Benzenepropanoic acid, trimethylsilyl ester	95%
30	27,595	4-Hydroxyphenylethanol, di-TMS	92%
55	39,965	Pyridine, 2-methyl-3-(trimethylsilyloxy)-4,5-bis-[(trimethylsilyloxy)methyl]-	94%
56	40,420	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	90%
59*	41,499	Gulose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	89%
62	44,236	9H-Purine, 9-(trimethylsilyl)-2,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	90%
83	54,120	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	90%
84*	55,172	Oleamide, N-trimethylsilyl-	84%

Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>; TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Identificação das substâncias presentes na fração SM-F2 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura

Pico	T _R	Nome da substância	Similaridade
5	7,115	Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	94%
6	13,075	Silane, trimethyl(2-phenylethoxy)-	93%
7*	14,875	Nicotinic acid-TMS	92%
8	15,593	Glycerol-tri-tms ether	93%
41	40,352	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	89%
54	44,295	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	88%
66	50,325	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	86%
71*	52,574	Tryptophan 2TMS	86%
73	53,708	9-Octadecenamide, (Z)-	93%
74	54,296	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	91%
76	58,630	1,2-Butadiene, 1,1,4-triphenyl-3-trimethylsilyl-4-trimethylsilyloxy-	83%
80	70,172	Tryptophan 2TMS	86%
81	70,574	L-Tryptophan, N,1-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	84%

Literatura: Web Nist: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>; TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans* sobre *C. albicans*

Para a escolha das concentrações a serem utilizadas nos modelos *in vivo* foi determinada a concentração inibitória mínima do extrato bruto e frações SM-F1, SM-F2 e SM-F5. No teste de microdiluição em caldo, para determinar a concentração inibitória mínima foram utilizadas concentrações variando de 1 a 15 mg/mL do extrato bruto e das frações SM-F1, SM-F2 e SM-F5. Apenas o extrato bruto e SM-F2 obtiveram atividade inibitória até a concentração testada, sendo 10 mg/mL e 15mg/mL, respectivamente.

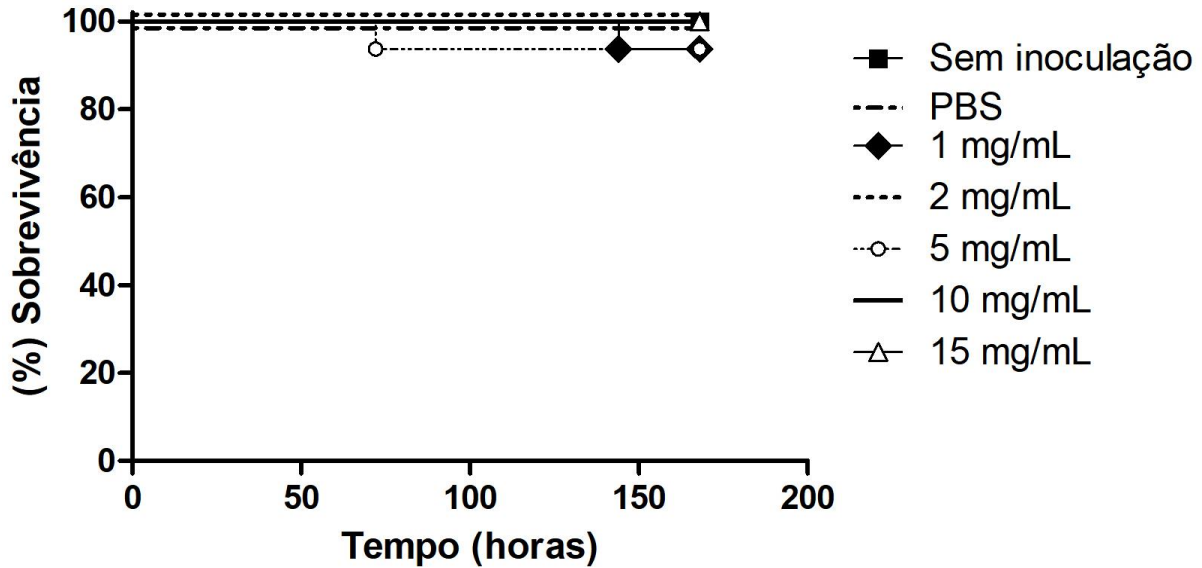
4.3 Efeitos do extrato bruto e frações da cultura de *S. mutans* sobre a candidose experimental no modelo de *Galleria mellonella*

4.3.1 Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

Primeiramente foi analisado a toxicidade do extrato bruto sobre as larvas de *G. mellonella* (Figura 20). Não foi observado efeito citotóxico ($p = 0,5334$) em nenhuma das concentrações inoculadas. Também foi realizada avaliação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *C. albicans* em diferentes concentrações (10^3 a 10^7 células/larva), para a determinação da concentração a ser adotada nos ensaios subsequentes. A concentração escolhida foi de 10^6 células/larva, causando 100% de morte das larvas durante as primeiras 24 h (Figura 21).

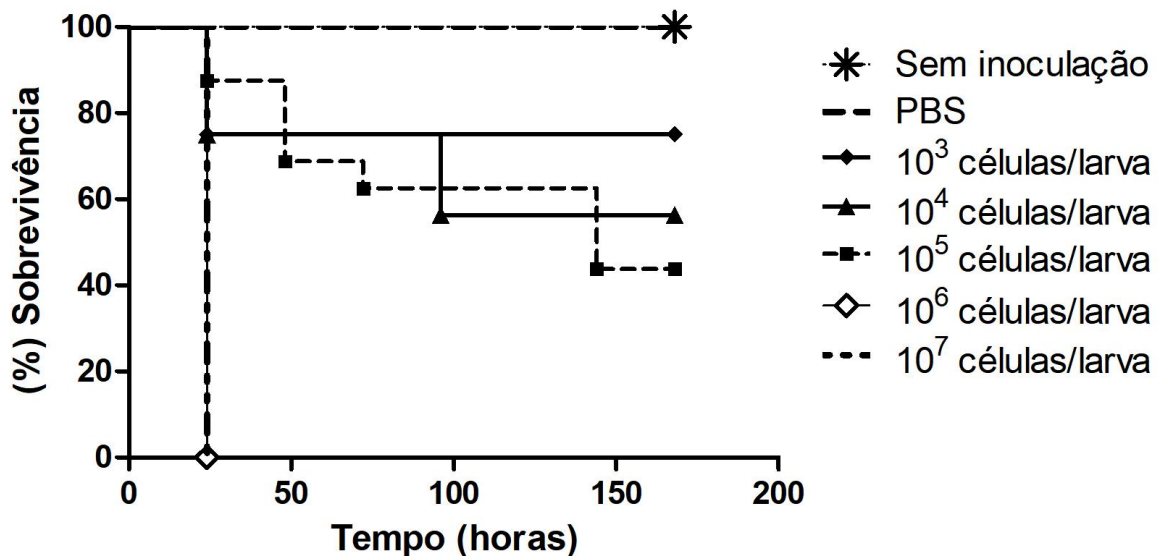
Em todos os grupos controles dos experimentos realizados a sobrevivência foi de 100%, demonstrando que não houve interferência da remessa de *G. mellonella* e nem da técnica empregada.

Figura 20 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* inoculadas com o extrato bruto nas concentrações de 1, 2, 5, 10 e 15 mg/mL



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* ATCC 18804 nas densidades celulares entre 10^3 a 10^7 células/larva

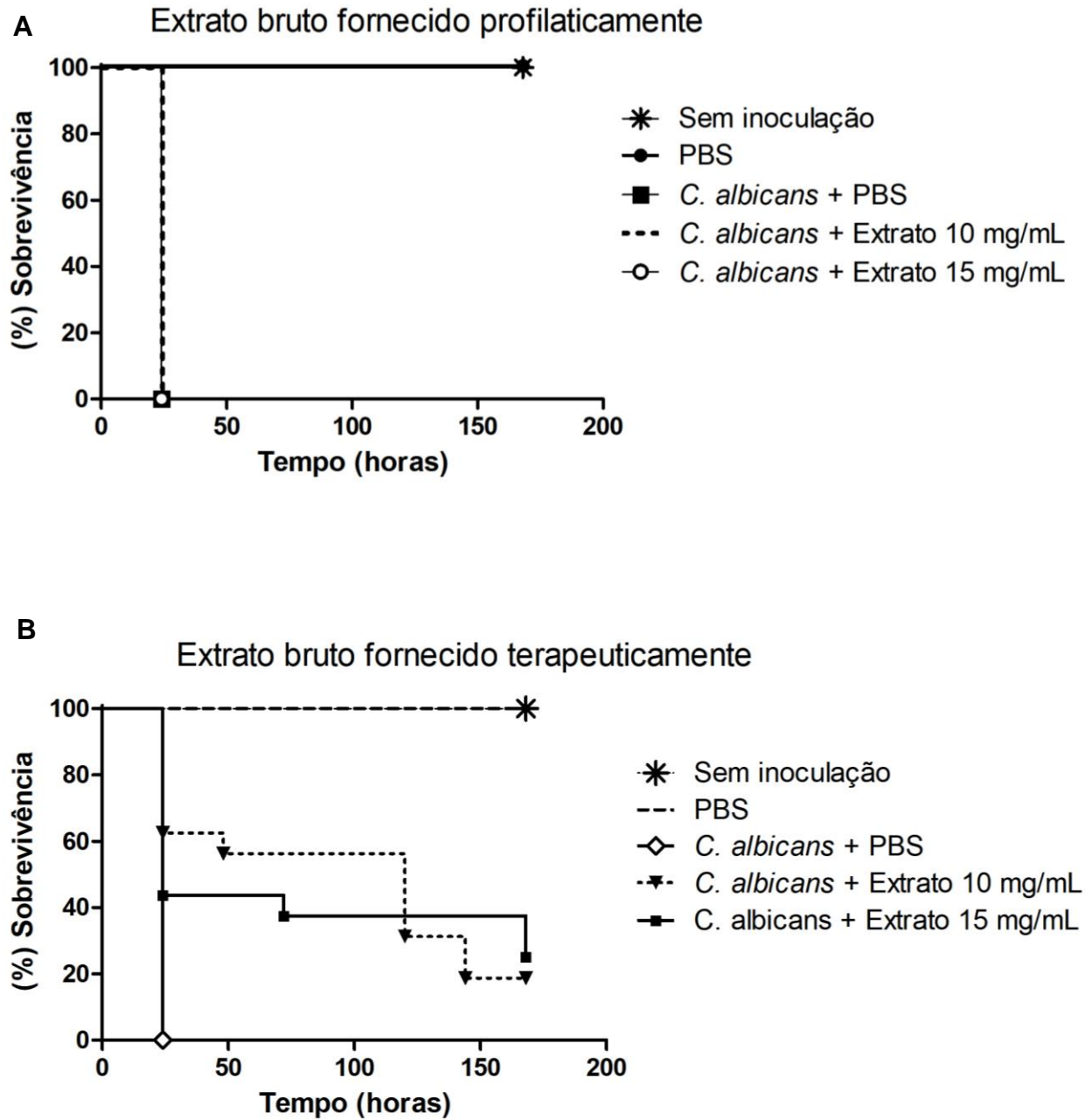


Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram avaliados os efeitos do extrato bruto nas concentrações de 10 e 15 mg/mL administrado de forma profilática, ou seja, 24 h antes da infecção por *C. albicans* e terapeuticamente, 30 min após a infecção. Não houve aumento da sobrevivência das larvas com a utilização profilática do extrato (Figura 22A), ocorrendo 100% de morte nas primeiras 24 h em ambos os grupos com infecção, indicando que o extrato bruto não possui efeitos imunomodulatórios em *G. mellonella*. No entanto, ao realizarmos o tratamento com o extrato bruto (Figura 22B) houve um aumento da sobrevivência em 18,75 e 25% para as larvas tratadas com 10 mg/mL ($p = 0,0002$) e 15 mg/mL ($p = 0,0032$) do extrato bruto, respectivamente, permanecendo larvas viáveis até o final do experimento (168 h).

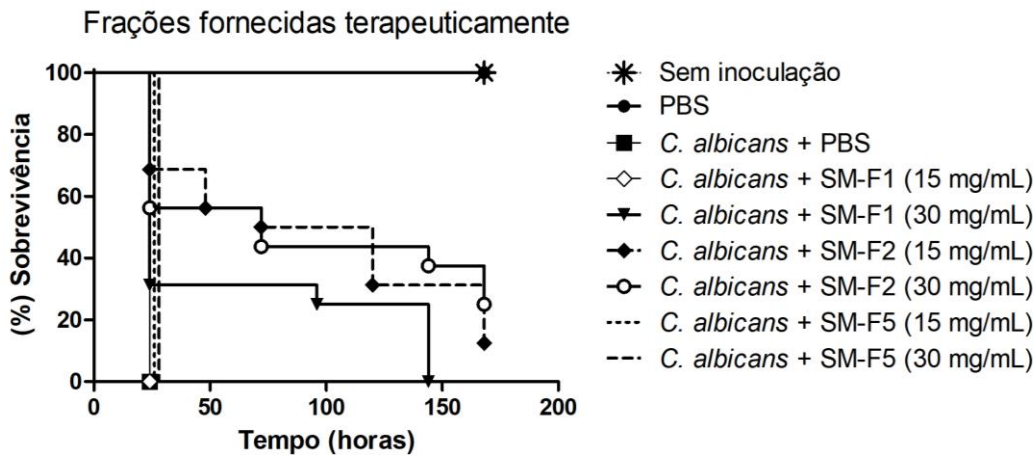
Como não houve efeito profilático para o extrato bruto, as frações foram administradas apenas terapeuticamente. Quando foi realizada a inoculação da fração SM-F1 na concentração de 30 mg/mL e da fração SM-F2 nas concentrações de 15 e 30 mg/mL a sobrevivência das larvas aumentou. No grupo tratado com a fração SM-F1 (30 mg/mL) houve aumento da sobrevivência ao compararmos com o grupo apenas com infecção por *C. albicans*, porém 100% das larvas morreram em 144 h ($p = 0,0166$), e com a inoculação da fração SM-F2, 12,5% ($p < 0,0001$) e 25% ($p = 0,0005$) de *G. mellonella* (15 mg/mL e 30 mg/mL, respectivamente) permaneceram vivas até o final do experimento. (Figura 23).

Figura 22 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* para os diferentes grupos experimentais



Legenda: A) Infecção por *C. albicans* e inoculação do extrato bruto fornecido profilaticamente ($p = 0,0138$) nas concentrações de 10 mg/mL e 15 mg/mL, B) Infecção por *C. albicans* e inoculação do extrato bruto fornecido terapêuticamente ($p < 0,0001$) nas concentrações de 10 mg/mL e 15 mg/mL.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* e inoculadas com as frações SM-F1, SM-F2 e SM-F5 fornecidas terapêuticamente nas concentrações de 10 mg/mL e 15 mg/mL ($p < 0.0001$)

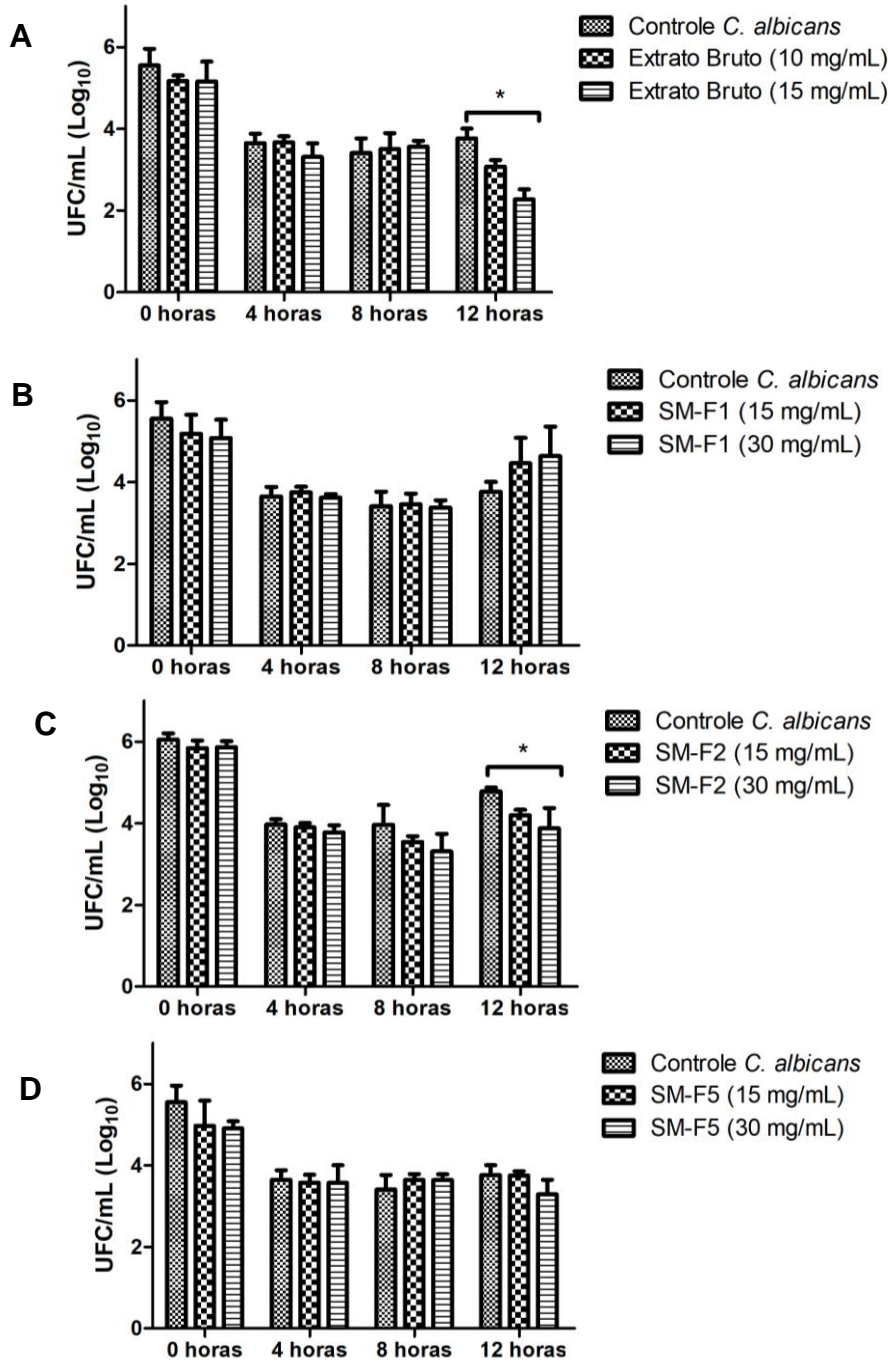


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL

Para quantificar a presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella* foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mL recuperadas da hemolinfa das larvas nos tempos de 0, 4, 8, 12 h após a infecção. Através dos resultados obtidos verificou-se haver um comportamento semelhante no crescimento de *C. albicans* em todos os grupos experimentais (Figura 24). Foi verificada diferença estatisticamente significativa ao compararmos o grupo controle de *C. albicans* com o grupo tratado com o extrato bruto e fração SM-F2 apenas no tempo de 12 h (Tabela 5 - 8). O extrato bruto e a fração SM-F2 não foram capazes de inibir *C. albicans* no início da infecção, mas após 12 h em contato com os tratamentos houve efeito inibitório significativo. Foi encontrada uma redução de 0,7 UFC/mL (Log_{10}) para o extrato bruto de 10 mg/mL e 1,5 UFC/mL (Log_{10}) para a concentração de 15 mg/mL no tempo de 12 h. Enquanto para a fração SM-F2 a redução foi de 0,58 UFC/mL (Log_{10}) e 0,90 UFC/mL (Log_{10}) nas concentrações de 15 mg/mL e 30 mg/mL. As frações SM-F1 e SM-F5 não inibiram significamente as células de *C. albicans* em nenhum dos tempos testados.

Figura 24 – Média e desvio-padrão da contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* para os diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8 e 12 h



Legenda: A) Infecção por *C. albicans* e tratamento com extrato bruto; B) Infecção por *C. albicans* e tratamento com SM-F1; C) Infecção por *C. albicans* e tratamento com SM-F2; D) Infecção por *C. albicans* e tratamento com SM-F5. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. albicans* nos diferentes tempos da infecção. *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Média e desvio-padrão dos valores da contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* obtidos nos ensaios experimentais realizados com o extrato bruto

Tempo (h)	Controle	Extrato Bruto 10 mg/mL	Valor de p^*	Extrato Bruto 15 mg/mL	Valor de p^{**}
0	5,549 ± 0,40	5,171 ± 0,13	0,2029	5,160 ± 0,48	0,3479
4	3,651 ± 0,23	3,664 ± 0,15	0,9374	3,309 ± 0,33	0,2169
8	3,407 ± 0,36	3,504 ± 0,39	0,7682	3,560 ± 0,14	0,5316
12	3,766 ± 0,24	3,070 ± 0,16	0,0143	2,273 ± 0,24	0,0017

*Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e Extrato Bruto 10 mg/mL. ** Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e Extrato Bruto 15 mg/mL. (Teste t de Student, $p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Média e desvio-padrão dos valores da contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* obtidos nos ensaios experimentais realizados com a fração SM-F1

Tempo (h)	Controle	Fração SM-F1 15 mg/mL	Valor de p^*	Fração SM-F1 30 mg/mL	Valor de p^{**}
0	5,549 ± 0,40	5,182 ± 0,46	0,3657	5,077 ± 0,45	0,2508
4	3,651 ± 0,23	3,750 ± 0,13	0,5576	3,617 ± 0,09	0,8240
8	3,407 ± 0,36	3,455 ± 0,26	0,8590	3,374 ± 0,18	0,8962
12	3,766 ± 0,24	4,460 ± 0,62	0,1462	4,640 ± 0,71	0,1151

*Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e Fração SM-F1 15 mg/mL. ** Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e SM-F1 30 mg/mL. (Teste t de Student, $p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Média e desvio-padrão dos valores da contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* obtidos nos ensaios experimentais realizados com a fração SM-F2

Tempo (h)	Controle	Fração SM-F2 15 mg/mL	Valor de p^*	Fração SM-F2 30 mg/mL	Valor de p^{**}
0	6,055 ± 0,14	5,840 ± 0,18	0,1913	5,867 ± 0,14	0,1843
4	3,967 ± 0,13	3,898 ± 0,10	0,5201	3,777 ± 0,17	0,2069
8	3,962 ± 0,48	3,544 ± 0,14	0,2269	3,313 ± 0,42	0,1576
12	4,779 ± 0,09	4,195 ± 0,13	0,0038	3,874 ± 0,49	0,0038

*Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e Fração SM-F2 15 mg/mL. ** Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e SM-F2 30 mg/mL. (Teste t de Student, $p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 - Média e desvio-padrão dos valores da contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* obtidos nos ensaios experimentais realizados com a fração SM-F5

Tempo (h)	Controle	Fração SM-F5 15 mg/mL	Valor de p^*	Fração SM-F5 30 mg/mL	Valor de p^{**}
0	5,549 ± 0,40	4,975 ± 0,61	0,2509	4,908 ± 0,17	0,0674
4	3,651 ± 0,23	3,579 ± 0,19	0,7001	3,571 ± 0,43	0,7903
8	3,407 ± 0,36	3,642 ± 0,14	0,3559	3,642 ± 0,14	0,3538
12	3,766 ± 0,24	3,756 ± 0,10	0,9505	3,295 ± 0,35	0,1297

*Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e Fração SM-F5 15 mg/mL. ** Valores de p obtidos na comparação dos grupos Controle e SM-F5 30 mg/mL. (Teste t de Student, $p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3 Densidade hemocitária

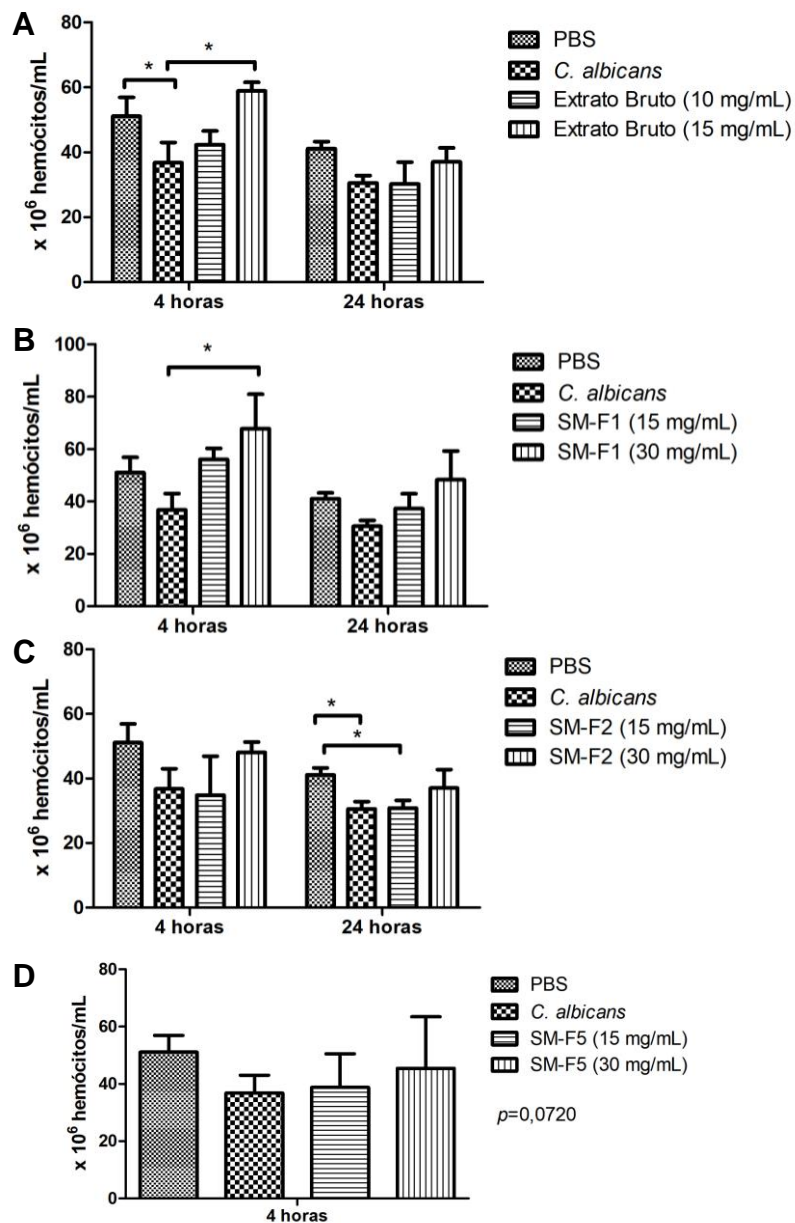
Na contagem total de hemócitos, células de *C. albicans* foram injetadas em *G. mellonella*, e posteriormente submetidas ao tratamento com o extrato bruto e frações. Com o término do tratamento, foram aguardados os tempos 4 e 24 h para a retirada da hemolinfa. Em todos os grupos tratados foi observado maior número na contagem de hemócitos em relação ao grupo apenas infectado. Além disso, houve diferença estatisticamente significativa para o grupo tratado com o extrato bruto (15 mg/mL) ($p=0,0027$) e fração SM-F1 (30 mg/mL) ($p = 0,0208$) comparado com o grupo controle de *C. albicans*, no tempo de 4 h, com um valor médio da contagem de hemócitos de $36,75 \times 10^6$ células/mL para o grupo com infecção por *C. albicans*, $58,92 \times 10^6$ células/mL para o extrato bruto e a maior contagem com $67,83 \times 10^6$ células/mL para a fração SM-F1.

Após 24 h foi observada diferença estatística do grupo PBS em relação ao grupo com infecção por *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F2 (15 mg/mL), com maior contagem para o grupo PBS ($41,080 \times 10^6$ células/mL), e valores similares para os grupos *C. albicans* ($30,580 \times 10^6$ células/mL) e SM-F2 ($30,830 \times 10^6$ células/mL). Todas as larvas do grupo tratado com a fração SM-F5 (15 e 30 mg/mL) morreram antes de completar 24 h, não sendo possível a realização do presente teste com essa fração (Figura 25).

Também foi observado que com a inoculação de *C. albicans* houve redução no número de hemócitos em relação ao grupo apenas com PBS, em todos os

ensaios experimentais, indicando que *C. albicans* pode suprimir a densidade celular nas larvas.

Figura 25 - Média e desvio padrão da contagem total de hemócitos das larvas de *G. mellonella* após 4 h e 24 h de infecção para os diferentes grupos experimentais



Legenda: A) Infecção por *C. albicans* e tratamento com extrato bruto; B) Infecção por *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F1; C) Infecção por *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F2; D) Infecção por *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F5, no tempo de 24 h não havia nenhuma larva tratada viva *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Efeitos do extrato bruto e frações SM-F1 e SM-F2 da cultura de *S. mutans* sobre a candidose bucal em modelo de camundongo imunossuprimido

A partir dos resultados em modelo invertebrado de *G. mellonella* foram realizados os testes em modelo de camundongo com o extrato bruto e frações SM-F1 e SM-F2. Embora, a maior atividade antifúngica em *G. mellonella* tenha sido observada com o extrato bruto e fração SM-F2, a fração SM-F1 também teve efeito na sobrevivência das larvas e por isso foi incluída nos testes em camundongos.

4.4.1 Recuperação de *Candida* da cavidade bucal dos camundongos

Foram analisados os dados de UFC/mL da recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos. Inicialmente, todos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva conforme demonstrado na Tabela 9. Nos animais do grupo controle, apenas com a infecção, foram observadas recuperação de $3,256 \pm 0,32$ UFC/mL (Log_{10}), e verificou-se que a contagem de UFC/mL foi menor do que todos os grupos com tratamento, sendo que a fração SM-F2 obteve a maior redução com média de $2,343 \pm 0,41$ UFC/mL, seguida pelo extrato bruto com recuperação média de $2,415 \pm 0,21$ UFC/mL (Log_{10}). Esses dados sugerem que os tratamentos, principalmente com a SM-F2, foram capazes de diminuir a colonização de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos imunossuprimidos (Figura 26).

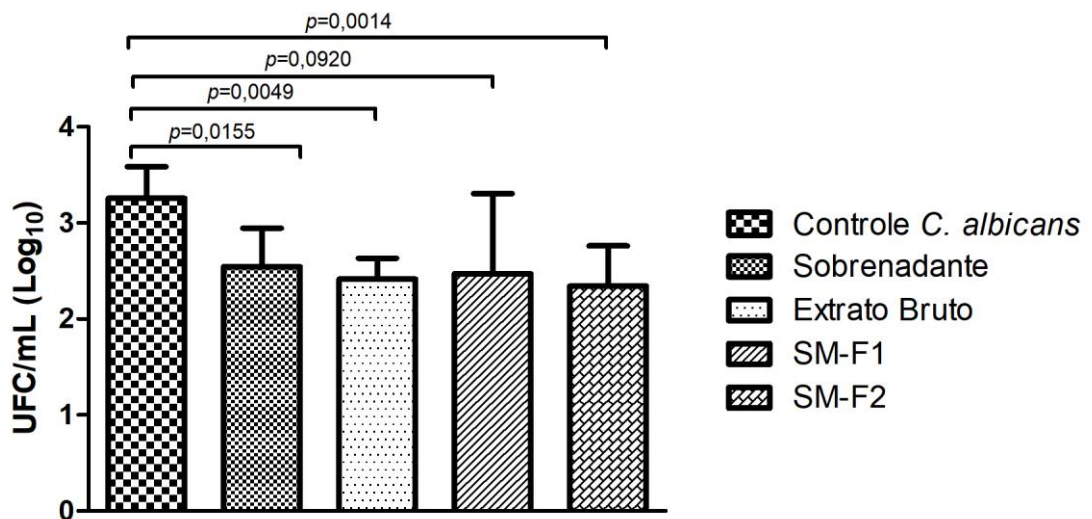
Tabela 9 - Estatística descritiva dos valores de UFC/mL (Log_{10}) obtidos na contagem de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos com candidose (grupos controle e tratamentos)

Grupos	Média	Mínimo	Mediana	Máximo	Valor de p^*
Controle	3,256 ± 0,32	2,944	3,079	3,643	0,0363
Sobrenadante	2,543 ± 0,40	1,954	2,653	2,987	
Extrato Bruto	2,415 ± 0,21	2,079	2,431	2,623	
Fração 1	2,653 ± 0,83	1,699	2,898	3,435	
Fração 2	2,343 ± 0,41	1,602	2,491	2,613	

*Valor de p obtido na comparação dos grupos experimentais (Teste ANOVA, $p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 – Contagem de UFC/mL após recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos imunossuprimidos



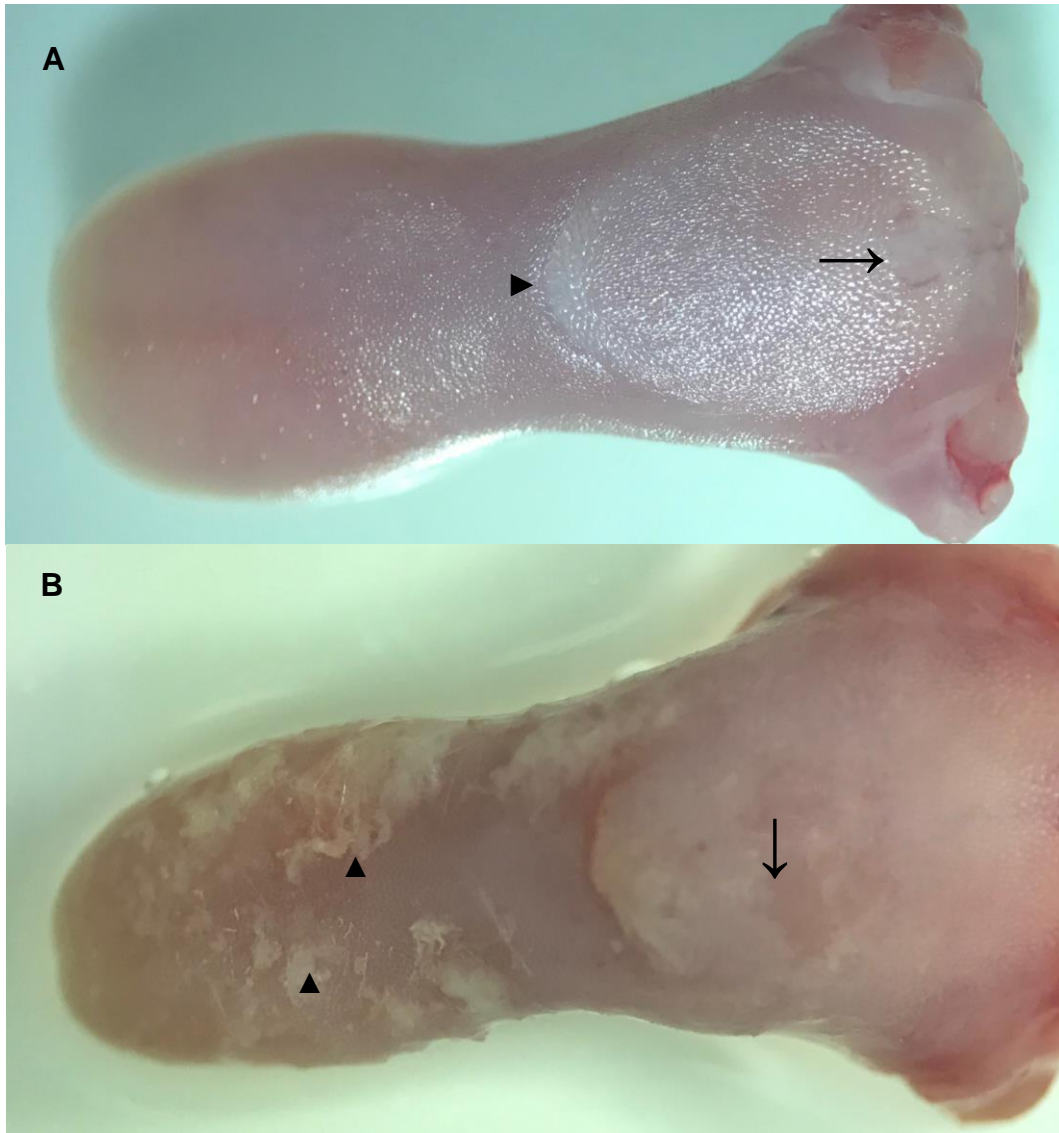
Legenda: Valores de p obtidos na comparação do grupo controle de *C. albicans* com os grupos com tratamento. (Teste t de Student, $p \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

A análise macroscópica revelou que todos os grupos inoculados com suspensões de *C. albicans* apresentaram lesões de candidose sobre o dorso da língua, confirmando que o modelo experimental de camundongo imunossuprimido pode ser considerado um modelo adequado para o estudo da patogênese da doença e análise de novas terapias antimicrobianas. Na análise macroscópica das línguas dos grupos com tratamentos houve melhora evidente da doença, demonstrada pela diminuição das lesões no dorso da língua dos animais. Essas lesões foram caracterizadas por regiões esbranquiçadas com áreas de atrofia papilar ou com presença de pseudomembrana (Figuras 27-31). O valor da mediana para o grupo controle foi maior do que para os demais grupos, com diferença estatisticamente significativa ao compararmos o grupo controle com o tratamento utilizando o extrato bruto e fração SM-F2 ($p = 0,0023$) (Figura 31). Houve melhora para o tratamento com o sobrenadante e com a fração SM-F1, sendo mais evidente para este último tratamento.

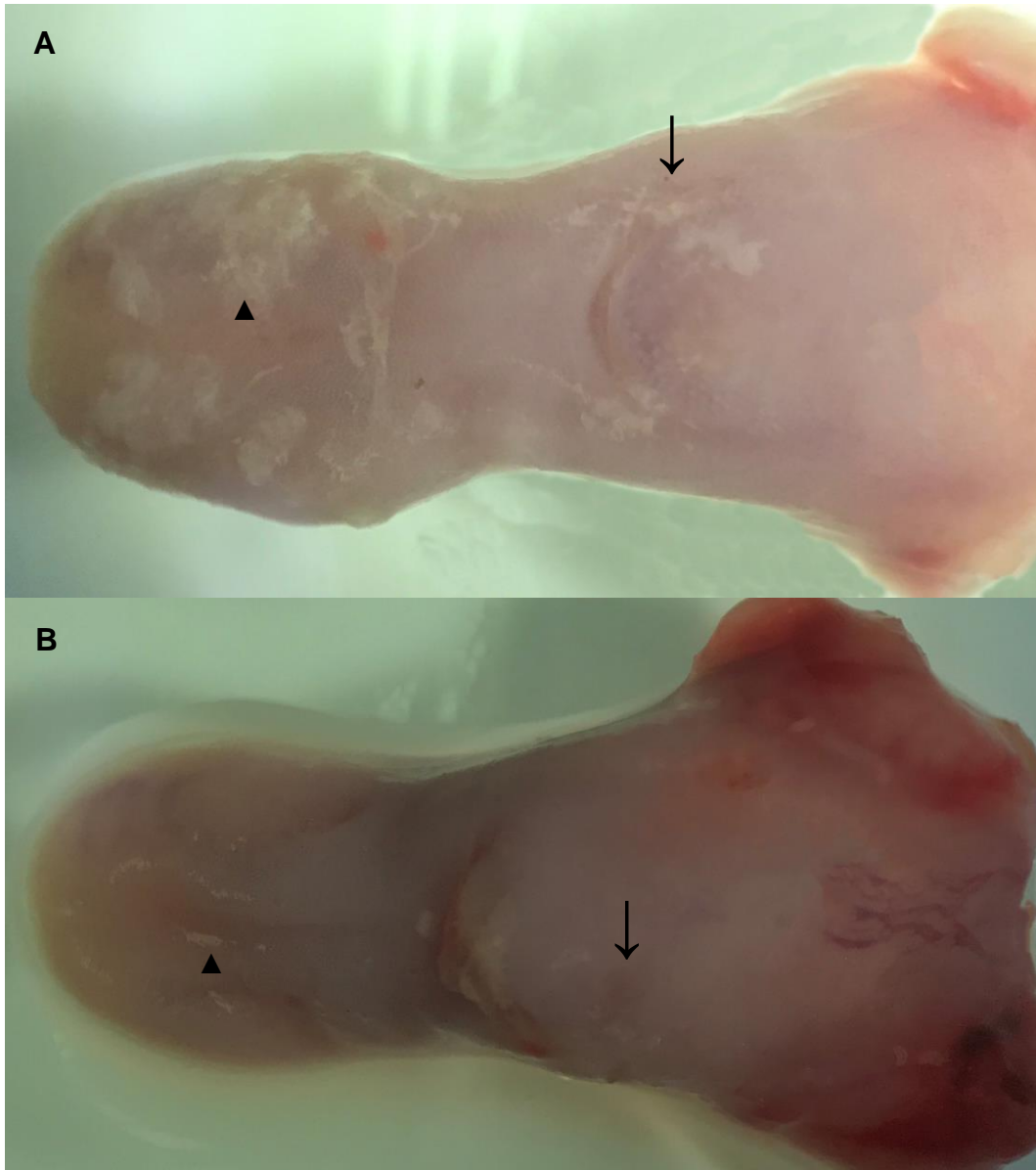
Figura 27 – Aspecto macroscópico do dorso das línguas dos camundongos dos grupos controle sem e com infecção por *C. albicans*



Legenda: A) língua saudável, sem candidose. A papila valada (→) separa a porção faríngea da língua. As papilas gigantes (▶) separam os dois terços anteriores da língua do tubérculo intermolar; e B) grupo controle com inoculação de *C. albicans* e sem tratamento, demonstrando a presença de regiões esbranquiçadas (▲) e atrofia papilar (↓).

Fonte: Elaborado pelo autor.

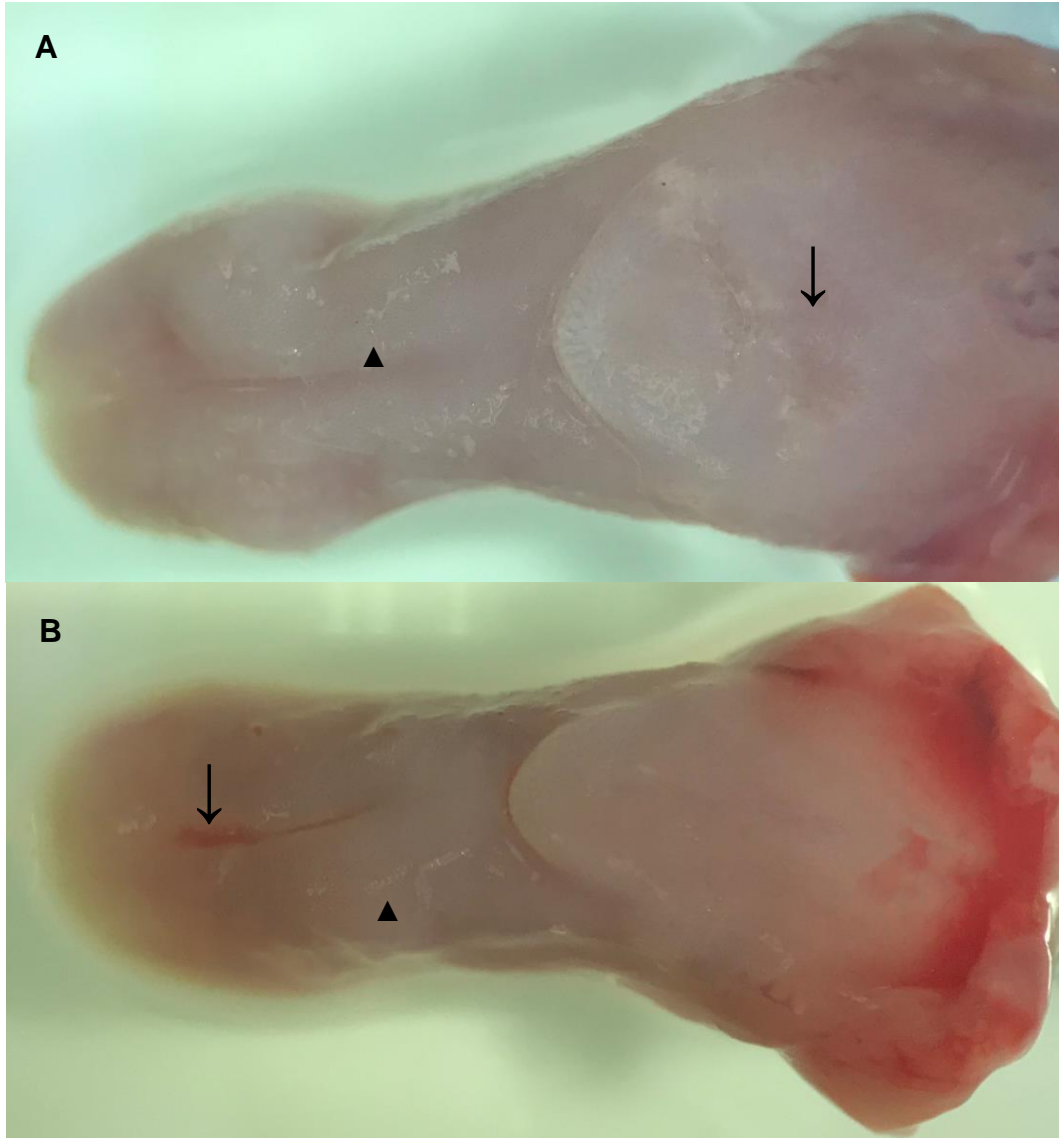
Figura 28 – Aspecto macroscópico do dorso das línguas dos camundongos dos grupos tratados com sobrenadante e extrato bruto



Legenda: A) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com sobrenadante; e B) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com extrato bruto, demonstrando a presença de regiões esbranquiçadas (▲) e atrofia papilar (↓) em menor quantidade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 – Aspecto macroscópico do dorso das línguas dos camundongos dos grupos tratados com as frações SM-F1 e SM-F2



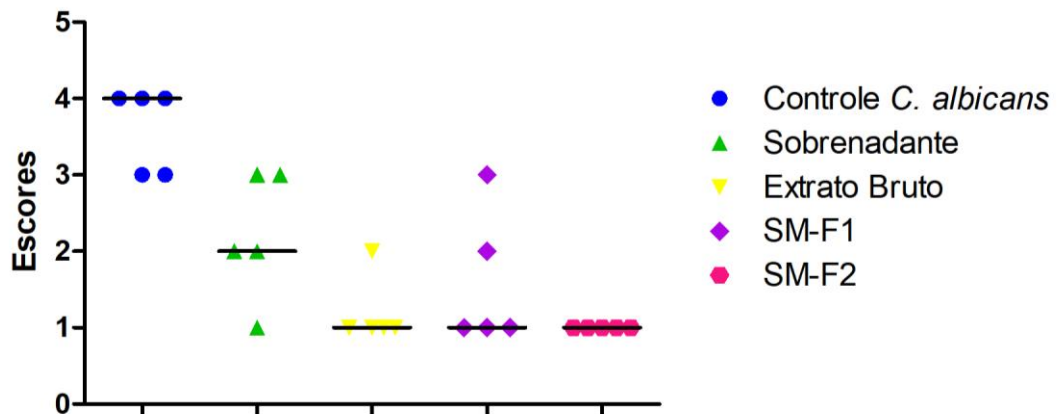
Legenda: A) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com a fração SM-F1; e B) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com fração SM-F2, demonstrando a presença de regiões esbranquiçadas (▲) e atrofia papilar (↓) em menor quantidade.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 - Lesão de candidose no dorso da língua do camundongo inoculado com *C. albicans*, caracterizada por regiões esbranquiçadas e formação de pseudomembranas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 - Escore e mediana dos grupos experimentais obtidos na análise macroscópica para cada animal (Kruskal - Wallis = 0,023).



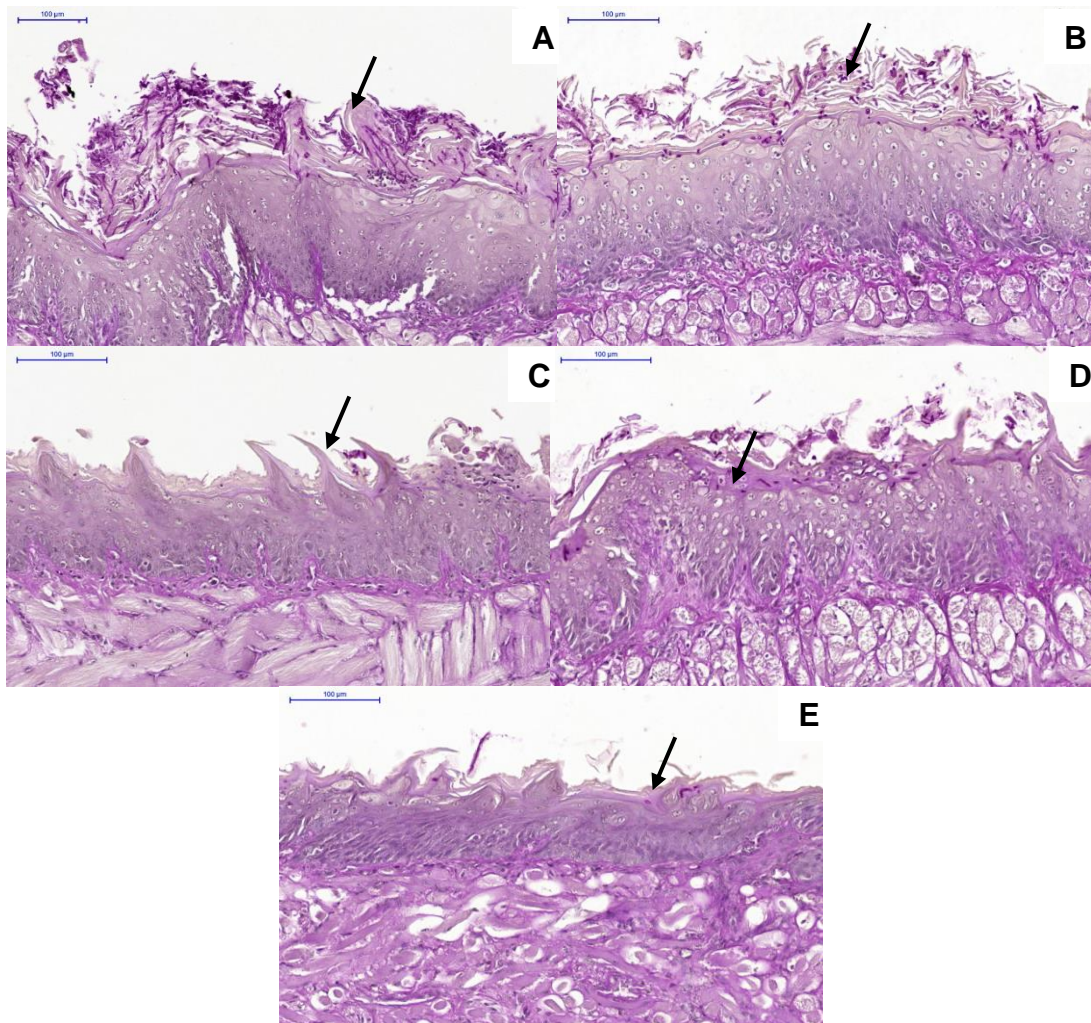
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3 Análise microscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

A análise microscópica foi realizada através da quantificação de hifas e leveduras, alterações presentes no tecido epitelial do dorso da língua dos camundongos e pela extensão do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo.

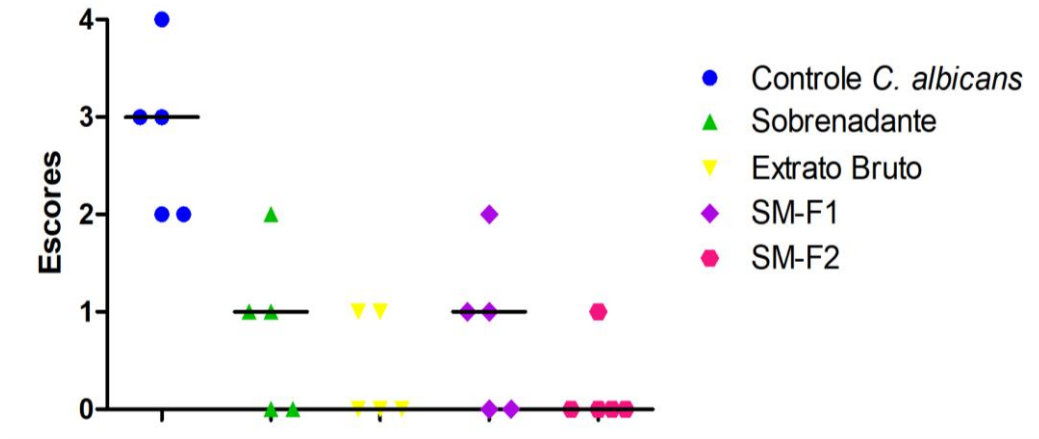
A coloração com ácido periódico-Schiff permitiu a visualização de hifas e leveduras, que na maioria dos cortes estavam limitadas na camada queratinizada do epitélio, em alguns casos do grupo controle de *C. albicans* foi encontrada invasão do epitélio, mas não no tecido conjuntivo (Figura 32). A presença de hifas e leveduras foi quantificada em 25 campos histológicos para cada animal, o grupo controle de *C. albicans* obteve a maior contagem de hifas e leveduras do que os grupos tratados, com diferença significativa entre este grupo e o tratamento com o extrato bruto e fração SM-F2 (Figura 33). A mediana dos escores foi de 3 para o grupo sem tratamento e de 0 para o extrato bruto e fração SM-F2. Também foi verificada melhora com o sobrenadante e a fração SM-F1, os quais tiveram mediana dos escores de 1.

Figura 32 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos



Legenda: A) grupo controle com inoculação de *C. albicans* e sem tratamento; B) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com sobrenadante; C) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com extrato bruto; D) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com SM-F1 e E) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com SM-F2. Leveduras e hifas (↓) na queratina. PAS.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

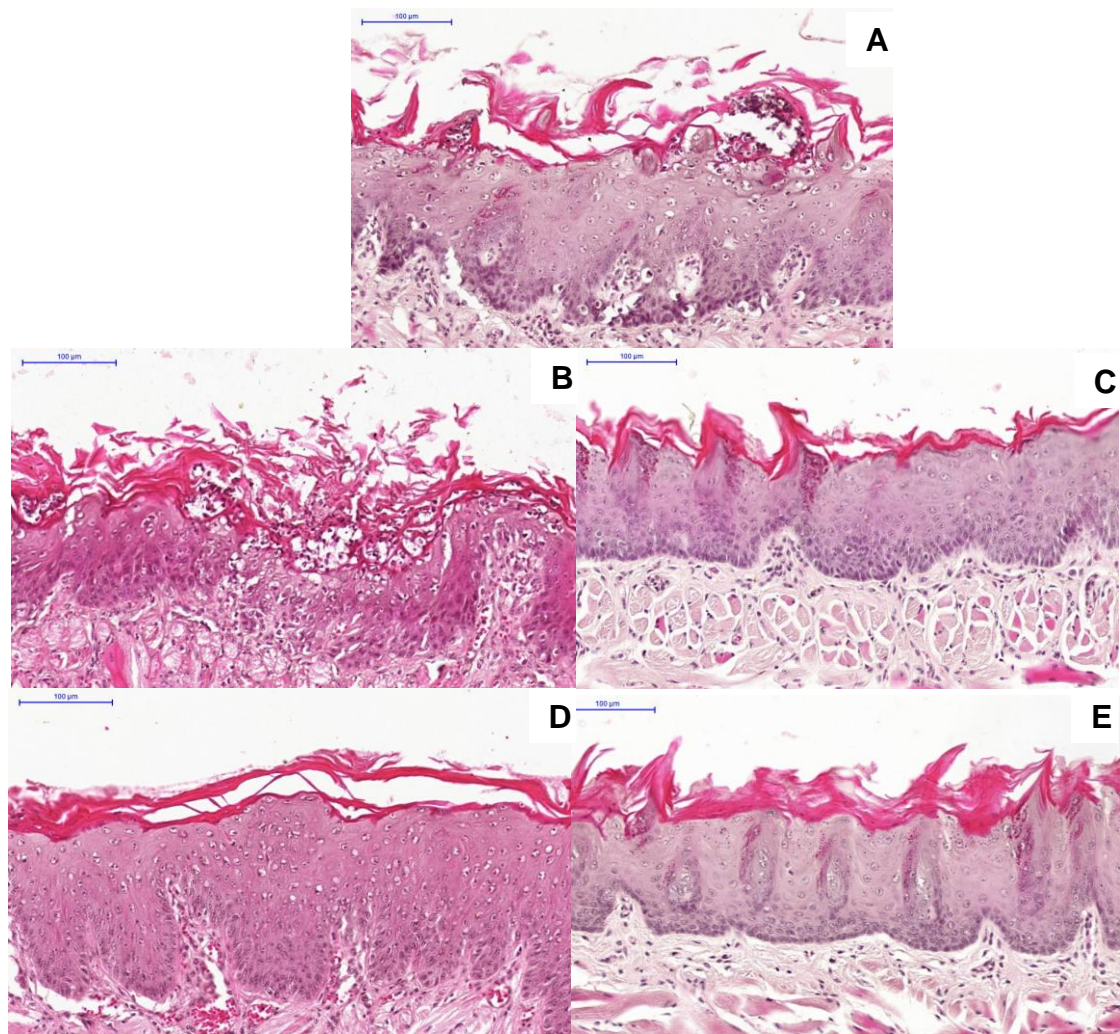
Figura 33 - Escores e mediana da contagem de hifas e leveduras nos 25 campos histológicos analisados para o controle de *C. albicans* e os grupos com tratamento (Kruskal-Wallis = 0,0086)



Fonte: Elaborado pelo autor.

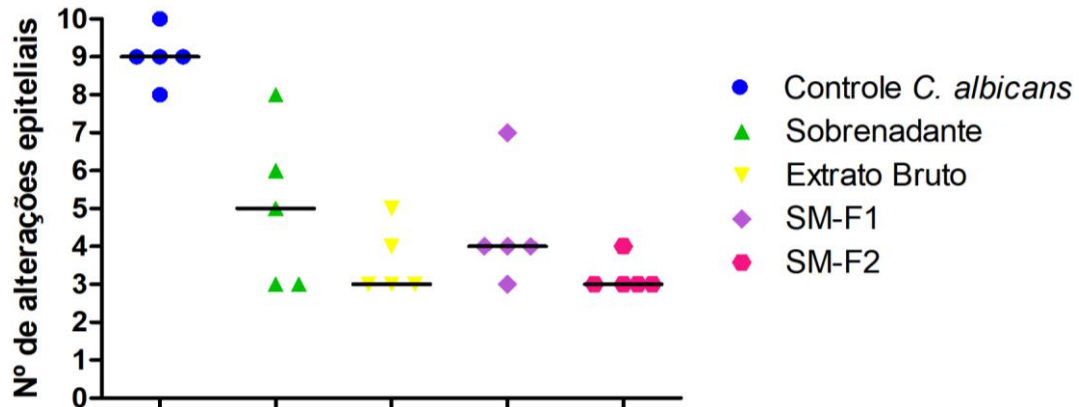
As alterações epiteliais foram mais evidentes em áreas de grande concentração de hifas e leveduras na camada queratinizada, onde encontramos grande parte das lesões, sendo as mais frequentes a perda das papilas filiformes, hiperqueratose, desorganização da camada basal, exocitose e espongirose (Figura 34). Assim como em todos os testes anteriores em modelo de camundongo deste estudo, a gravidade da doença foi maior no grupo sem tratamento, mostrado pelo alto número de alterações epiteliais do dorso das línguas dos camundongos inoculados apenas com suspensões de *Candida* e que não foram tratados. No grupo controle a mediana foi de 9, enquanto que variou de 3 a 5 nos tratamentos, com menor valor para o extrato bruto e fração SM-F2 (Figura 35).

Figura 34 - Corte sagital do dorso da língua dos camundongos



Legenda: A) Grupo controle com inoculação de *C. albicans* e sem tratamento, com presença de microabcesso intraepitelial, exocitose, espongiose. Na lâmina própria observa-se infiltrado inflamatório moderado; B) grupo inoculado com *C. albicans* e tratamento com sobrenadante, mostrando presença de exocitose, espongiose, perda da estratificação e descamação epitelial; C) tratamento com extrato bruto, com perda das papilas filiformes; D) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com SM-F1, mostrando perda das papilas filiformes, espongiose e hiperplasia epitelial; e E) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com SM-F2, com presença de hiperqueratose. HE
 Fonte: Elaborado pelo autor.

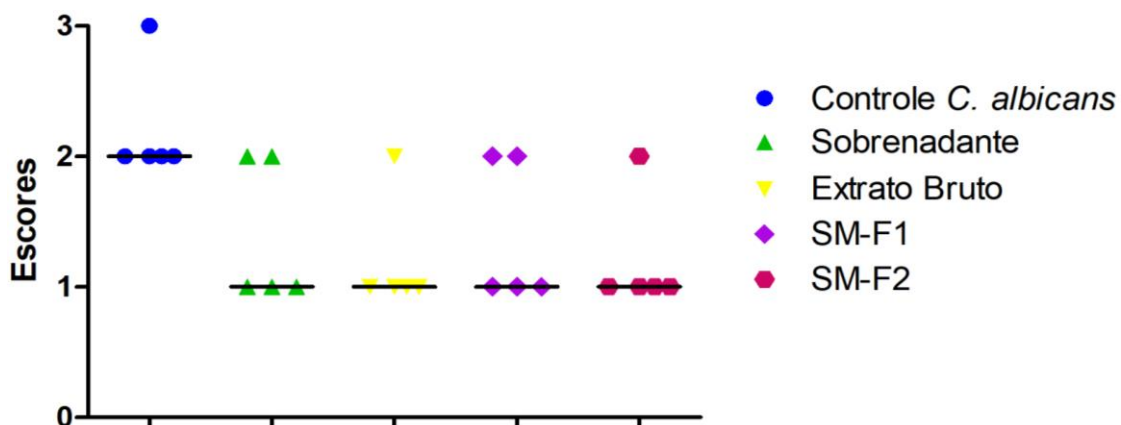
Figura 35 - Número de alterações epiteliais e medianas observadas nas lesões microscópicas de candidose no dorso da língua dos camundongos conforme os diferentes grupos (Kruskal – Wallis = 0,0051)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O infiltrado inflamatório foi avaliado conforme sua intensidade, grau leve, moderado e severo. Nas lâminas das línguas que não receberam tratamento (grupo controle) foi observado infiltrado inflamatório severo e moderado, já para os demais grupos foi encontrado infiltrado variando do leve ao moderado (Figura 36).

Figura 36 - Escores e medianas da extensão do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo observadas nas lesões microscópicas de candidose no dorso da língua dos camundongos conforme os diferentes grupos (Kruskal – Wallis = 0,0508)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O tratamento de infecções fúngicas é considerado difícil devido à limitada disponibilidade de agentes antifúngicos e ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos. O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e abordagens terapêuticas para essas infecções são, portanto, urgentemente necessários. As interações entre os micro-organismos têm sido bastante estudadas (Fox et al., 2014; Dhamgaye et al., 2016) e sabe-se que nos biofilmes mistos, as bactérias podem estar associadas com redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas, à liberação direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes. Outro mecanismo de interação entre bactérias e fungos é a modificação nas condições ambientais, como a mudança no pH, que pode influenciar a formação de hifas por *C. albicans* (Peleg et al., 2010).

O reconhecimento de que *C. albicans* é um importante patógeno, especialmente em pacientes imunocomprometidos, levou ao desenvolvimento de modelos experimentais adequados que permitem controlar e manipular os ensaios necessários, para obter conhecimento do processo da doença (Samaranayake et al., 2001; Junqueira et al., 2012).

O uso de modelos hospedeiros de invertebrados tem benefícios significativos quando comparados aos mamíferos: não há preocupações éticas ou legais, não há necessidade de instalações habitacionais, o manejo do animal é fácil, nenhuma anestesia é necessária e o uso de grandes números de amostra no mesmo grupo são possíveis. *G. mellonella* tem sido usada para estudar as interações patógeno-hospedeiro e avaliação de possíveis terapias antimicrobianas, sendo um modelo alternativo para mamíferos, como camundongos e ratos (Junior et al., 2013; Astvad et al., 2017). Em nosso estudo, *G. mellonella* foi utilizada para uma triagem inicial e posteriormente foram escolhidos os melhores tratamentos para os testes em modelo de candidose em camundongos imunossuprimidos, diminuindo dessa forma a utilização dos modelos vertebrados.

Em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (Barbosa et al., 2016), foram analisados os efeitos de *S. mutans* sobre o crescimento e patogenicidade de *C.*

albicans por meio de estudos *in vitro* e em *G. mellonella*. Foram testados os efeitos diretos das células de *S. mutans*, bem como os efeitos indiretos dos subprodutos secretados por este micro-organismo, utilizando apenas o filtrado da cultura bacteriana. No estudo *in vitro* foi observado uma redução das células viáveis do biofilme e a inibição do crescimento das hifas quando *C. albicans* foi colocada em contato com o filtrado da cultura de *S. mutans*. No estudo *in vivo*, a injeção de células de *S. mutans* ou filtrado da cultura de *S. mutans* em larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* aumentou a sobrevivência desses animais. Além disso, uma redução na formação de hifas foi observada nos tecidos larvais quando *C. albicans* foi associada ao filtrado de cultura de *S. mutans*. Esses achados sugerem que *S. mutans* podem secretar subprodutos capazes de inibir a formação do biofilme, a morfogênese e a patogenicidade de *C. albicans*, atenuando a candidose experimental no modelo de *G. mellonella*.

Jarosz et al. (2009) investigaram a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* com base na produção de moléculas secretadas. Eles testaram o efeito do sobrenadante sobre a formação de tubo germinativo de *C. albicans* em diferentes fases do crescimento de *S. mutans* (culturas de 4, 6, 8 e 24h). Apenas o tempo de 4 h foi capaz de inibir a formação de tubo germinativo, indicando que *S. mutans* secreta moléculas do quorum sensing durante os estágios iniciais de crescimento, que inibem a transição morfológica do fungo.

Diante do exposto, o presente trabalho explorou os efeitos das substâncias produzidas por *S. mutans* sobre a candidose experimental em modelos *in vivo*, obtendo-se o extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans* de 4 h de crescimento. Inicialmente, para a escolha da concentração do extrato bruto e frações a ser utilizada nos testes em modelo de *G. mellonella* foi determinada a concentração inibitória mínima. A CIM foi de 10 mg/mL e 15 mg/mL para extrato bruto e fração SM-F2, respectivamente, já as frações SM-F1 e SM-F5 não foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* até a concentração testada.

O extrato bruto foi administrado antes e após a infecção de *G. mellonella* por *C. albicans*, procurando-se avaliar seus efeitos profiláticos e terapêuticos. Na administração do extrato de forma profilática não houve melhora na sobrevivência das larvas, ocorrendo 100% de morte nas primeiras 24 h, indicando que o extrato não foi capaz de estimular o sistema imune nesse modelo. A resposta imune

induzida em *G. mellonella* pode ser usada em comparação com a resposta imune inata de mamíferos, ambos os organismos têm estruturas/barreiras para obstruir patógenos invasores e respostas celulares contra micro-organismos. As células fagocitárias agem sobre os patógenos invasores uma vez que chegam ao hospedeiro. Um possível mecanismo para manipular essa resposta é estimulando a resposta imune através de tratamento profilático (Fuchs et al., 2016), porém o extrato testado não obteve resultados favoráveis na modulação da resposta imune, por esse motivo as frações foram então testadas somente de forma terapêutica.

Ao realizarmos o tratamento com o extrato bruto, após a infecção das larvas por *C. albicans*, houve um aumento da sobrevivência em 18,75 e 25% do grupo tratado com 10 e 15 mg/mL, respectivamente, permanecendo larvas viáveis até o final do experimento (168 h). Na inoculação da fração SM-F1 na concentração de 30 mg/mL e da SM-F2 em ambas as concentrações a sobrevivência das larvas aumentou, permanecendo 12,5 e 25% de *G. mellonella* vivas para o grupo SM-F2 (15 mg/mL e 30 mg/mL, respectivamente). Com a utilização da SM-F1 (30 mg/mL) também houve aumento da sobrevivência ao compararmos com o grupo apenas com infecção por *C. albicans* que teve morte de todas as larvas até 24 h, enquanto 100% das larvas morreram no tempo de 144 h ao utilizar o tratamento com a fração. Ou seja, os tratamentos prolongaram a taxa de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans*, demonstrando que alguma substância produzida por *S. mutans* pode ter reduzido a patogenicidade desse fungo nesses animais.

Uma vez que neste estudo, as larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com uma quantidade conhecida de *C. albicans* por injeção de células fúngicas diretamente na hemolinfa, também foram avaliados os efeitos dos tratamentos em células de *C. albicans* em diferentes momentos da infecção. O número de células de *C. albicans* recuperadas imediatamente após a inoculação (0 h) não diferiu da carga fúngica inoculada, no entanto, uma redução no número foi observada nos tempos subsequentes após a inoculação (4 e 8 h), sugerindo que o sistema imune larval foi capaz de combater a infecção com *C. albicans*, reduzindo a contagem de UFC/mL nesses tempos de infecção. Porém, após esse período, *C. albicans* teve um aumento na sua contagem sugerindo que esses micro-organismos estavam superando o sistema imunológico de *G. mellonella*, com uma maior proliferação às 12 h. Os resultados mostraram que o número de micro-organismos recuperados da

hemolinfa das larvas do grupo controle nas primeiras 8 h da infecção, não diferiu significativamente do número de ambos os grupos com tratamento. No entanto, observou-se redução de células recuperadas após 12 h para o tratamento com o extrato bruto e fração SM-F2. Esses dados indicam que o extrato bruto e SM-F2 de *S. mutans* contém substâncias com atividade antifúngica que não agem no início da infecção, sendo necessário um tempo para que seu efeito ocorra sobre as células de *C. albicans*.

Além da contagem de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa de *G. mellonella*, a candidose experimental foi avaliada através da contagem total de hemócitos presente na hemolinfa das larvas. Foi verificado que todos os grupos tratados aumentaram o número na contagem de hemócitos em relação ao grupo apenas infectado. O extrato bruto e a fração SM-F1 mostraram diferença significativa, o que sugere que esses tratamentos foram capazes de estimular a resposta imune celular das larvas nas primeiras 4 h, no entanto com o passar do tempo essa resposta diminuiu até às 24 h do teste. Como foi visto anteriormente pela curva de sobrevivência, ao realizar a inoculação do extrato bruto de forma profilática, não houve melhora na sobrevivência das larvas, indicando que essa resposta ocorre apenas no início e não consegue se manter durante o decorrer da doença.

Também foi observado que o grupo inoculado com *C. albicans* teve redução do número de hemócitos em relação ao grupo controle de PBS, indicando que *C. albicans* suprime a contagem dessas células. Segundo Rossoni et al. (2017) o nível das células dos hemócitos pode ser utilizado para determinar a patogenicidade dos micro-organismos, as modulações da resposta imune e, conseqüentemente, verificar o estado da saúde e/ou doença das larvas. Exame de alterações na densidade de hemócitos feito por Bergin et al. (2003) indicaram que uma baixa taxa de sobrevivência está correlacionada com uma densidade de hemócitos reduzida, enquanto que uma elevada taxa de sobrevivência está correlacionada com uma densidade próxima à das larvas de controle com PBS, o que coincide com nossos resultados nos testes em *G. mellonella*.

Barbosa et al. (2016), ao utilizar o sobrenadante da cultura de *S. mutans* na análise histológica do corpo de gordura e outras estruturas internas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*, verificaram redução significativa de hifas quando *C. albicans* foi associado ao sobrenadante, o que confirmou as análises de microscopia

eletrônica de varredura e filamentação *in vitro* realizados inicialmente por esses autores. Estes resultados mostram que *S. mutans* pode secretar subprodutos no meio de cultura que são capazes de inibir a transição morfológica de *C. albicans*. A diferenciação das hifas de *C. albicans* é crucial para a formação de biofilmes, como é para muitos outros aspectos de sua patogenicidade (Saville et al., 2003).

Graham et al. (2017) demonstraram que a bacteriocina EntV de *E. faecalis* inibe potentemente o crescimento do biofilme de *C. albicans*, impedindo a mudança para a forma filamentosa. As implicações desta atividade inibitória foram claramente vistas na diminuição da virulência de células de *C. albicans* expostas a esse peptídeo em *C. elegans*, nos macrófagos e no modelo murino. EntV é uma bacteriocina originalmente estudada por sua atividade bactericida contra microorganismos Gram-positivos, incluindo espécies de Lactococos e Estreptococos. A atividade bactericida de EntV não se deve à lise e nem há evidência de uma proteína de imunidade, o mecanismo ainda permanece enigmático (Dundar et al., 2015). Do mesmo modo, o mecanismo da atividade anti-hifa não é claro, embora ainda não faça lisar células fúngicas, o EntV exerce um verdadeiro efeito antivirulento sobre este importante patógeno fúngico. Sugere-se que a terapêutica que visa a virulência pode ser menos propensa a resistência microbiana (Graham et al., 2017).

Em apoio a esta ideia, Pierce et al. (2015) testaram diversas moléculas fornecidas pela biblioteca NOVACore (Chembridge Corporation) com efeito sobre biofilme de *C. albicans* e propriedades inibidoras da morfogênese das hifas e verificaram a não indução de resistência após exposição repetida ao composto da família diazapirodecano ($C_{24}H_{32}N_4O$). Uma vez que foi estabelecido que o composto principal não afetou o crescimento sob condições planctônicas, foi realizado uma série de experimentos para avaliar o potencial para induzir resistência após a exposição repetida a esta molécula. Nesses experimentos, as populações experimentais de *C. albicans* foram expostas a concentrações deste composto em que inibe a filamentação e formação de biofilmes, mas não inibe o crescimento planctônico. A concentração nos primeiros 40 dias foi de 5 μ M, que foi então aumentada para 20 μ M durante 20 dias adicionais. As culturas cultivadas sob condições de indução de filamentação foram monitoradas quanto à formação de hifas antes das transferências diárias, e não havia evidências de que o composto

tivesse perdido qualquer atividade inibidora durante todo o período dos experimentos. Além disso, quando as células das populações microbianas evoluíram na presença do fármaco e recuperadas em diferentes pontos de tempo durante os ensaios experimentais, foram então utilizadas para desenvolver novos biofilmes, e não foi observado alteração na concentração em que o composto testado foi capaz de exercer sua atividade inibidora no biofilme. Assim, foi concluído que esta estratégia de antivirulência é altamente improvável promover o surgimento de resistência.

A atividade antifúngica do extrato e frações SM-F1 e SM-F2 foi confirmada no modelo experimental de camundongo imunossuprimido, ao encontrarmos diminuição da severidade das lesões com apenas uma aplicação dos tratamentos. Nos animais do grupo controle, apenas com a infecção, foi observado maior colonização por *C. albicans* ($3,256 \pm 0,32$ UFC/mL (Log_{10})) comparado com todos os tratamentos, sendo que a fração SM-F2 obteve a maior redução com média de $2,343 \pm 0,41$ UFC/mL (Log_{10}), seguida pelo extrato bruto com recuperação de $2,415 \pm 0,21$ UFC/mL (Log_{10}).

Assim como em nosso estudo, Graham et al. (2017) estudou os efeitos da bacteriocina de *E. faecalis*, EntV, em modelo murino de candidose, o EntV reduziu, mas não eliminou a colonização fúngica. Em contraste, a invasão fúngica do epitélio e a inflamação, responsáveis pela patologia, estavam quase inteiramente ausentes. Assim, na presença de EntV, *C. albicans* reverte para uma interação comensal benigna com o hospedeiro. Em contrapartida, o EntV não afeta o crescimento de hifas estimulado pelo soro de mamífero, que é o principal fator indutor (Cruz et al., 2013).

Pierce et al. (2015) investigaram o potencial de um total de 20.000 compostos, chegando ao $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_{4}\text{O}$ que foi testado terapeuticamente em modelo murino de candidose hematogênica. Em consonância com o seu efeito na morfologia fúngica, observações histológicas indicaram que o tratamento com o composto inibiu a filamentação *in vivo*. Nos rins (o órgão alvo principal) dos animais tratados continham células fúngicas semelhantes à levedura ou parcialmente alongadas, em oposição à lesões típicas contendo células filamentosas, observadas em secções de tecido obtidas de animais não tratados.

Coincidindo com a recuperação de *C. albicans* no dorso das línguas dos animais, os resultados macroscópicos e microscópicos evidenciaram o efeito dos tratamentos pela diminuição de lesões características da doença. Como visto macroscopicamente, regiões esbranquiçadas com áreas de atrofia papilar ou com presença de pseudomembrana, principalmente no grupo controle, e diminuição mais significativa dessas lesões foi evidenciada com os tratamentos pelo extrato bruto e SM-F2. Também houve melhora para o tratamento com o sobrenadante e com a fração SM-F1, sendo mais marcante para este último, já que nas línguas dos camundongos tratados com o sobrenadante ainda foi possível visualizar placas brancas extensas. Isso pode ser explicado pela menor concentração de substâncias no sobrenadante e, além disso, por ser líquido, a deglutição pelos animais é facilitada, o que provavelmente fez com que esse tratamento ficasse em contato com as lesões por um período menor. O preparo do extrato e frações teve como objetivo manter esses tratamentos mais viscosos, sendo realizada diluição em uma quantidade pequena de líquido, o que conseqüentemente dificulta sua eliminação pelos animais, ficando em contato com as lesões por um período superior.

Na análise microscópica foi visualizada maior colonização de hifas e leveduras no grupo controle de *C. albicans* do que nos grupos tratados, com diferença significativa com tratamento pelo extrato bruto e fração SM-F2. A maior mediana dos escores foi de 3 para o grupo sem tratamento e de 0 para o extrato bruto e SM-F2, no entanto também foi verificada diminuição do fungo com a utilização do sobrenadante e a fração SM-F1, os quais tiveram mediana dos escores de 1. A penetração no epitélio e presença de hifas foi visualizada com maior frequência nos animais sem tratamento, já nos animais inoculados com extrato e frações as leveduras presentes encontravam-se limitadas à camada córnea da mucosa da língua.

As alterações epiteliais foram mais evidentes em áreas de grande concentração de hifas e leveduras, onde encontramos maior parte das lesões, sendo as mais frequentes a perda das papilas filiformes, hiperqueratose, desorganização da camada basal, exocitose e espongirose. Mas também foram quantificadas lesões encontradas com menor frequência como acantólise, hiperplasia epitelial, descamação, perda da estratificação e formação de microabscessos intraepitelial. Assim como em todos os testes anteriores em modelo de camundongo, a gravidade

da doença foi maior no grupo sem tratamento, mostrado pelo alto número de alterações epiteliais do dorso das línguas desses camundongos, nesse grupo a mediana foi de 9, variando de 3 a 5 nos tratamentos, com menor valor para o extrato bruto e fração SM-F2.

Diante dos resultados promissores obtidos com os extratos da cultura de *S. mutans* sobre *C. albicans* e inibição da candidose experimental, esse trabalho foi estendido para a identificação das substâncias presentes no extrato bruto e suas frações.

Na literatura, existem alguns pesquisadores que também estão buscando caracterizar substâncias produzidas por *S. mutans* que tenha atividade antimicrobiana (Nicolas et al., 2011, Jarosz et al., 2009). Desse modo, Nicolas et al. (2011) produziram e caracterizaram mutacinas adicionais e encontraram novas substâncias que apresentaram atividade contra patógenos bacterianos. Duas bacteriocinas de *S. mutans*, a mutacina F-59.1 produzida em meio líquido e a mutacina D-123.1 obtida em meio semi-sólido, foram isoladas e caracterizadas em termos de massa molecular, sequência e espectros de atividade. As mutacinas foram purificadas por cromatografia hidrofóbica, as sequências dos aminoácidos foram obtidas pela degradação de Edman e sua massa molecular foi determinada por espectrometria de massa. Os espectros de atividade antibacteriana dessas mutacinas indicaram um uso promissor no controle de numerosos agentes microbianos.

Além de *S. mutans*, outras espécies de micro-organismos têm sido investigadas em relação à possível produção de substâncias com ação antimicrobiana. Wahaab et al. (2017) isolaram 131 cepas de *Actinomycetes*, sendo que 85% exibiram diferentes níveis de atividade antagônica contra patógenos, através da utilização do filtrado da cultura e extrato bruto do filtrado. Os extratos tiveram maior atividade contra bactérias resistentes a múltiplos fármacos, e assim como em nosso trabalho o solvente acetato de etila foi o escolhido para extrair metabólitos das espécies estudadas. Na análise por cromatografia em camada fina de alto desempenho, a presença de macrolídeos, terpenóides e quinolonas foi identificada no extrato. Na análise GC-EM, vários compostos potentes, tais como composto fenólico-2,6-di-tert-butilfenol, composto alcalino-1H, 5H, pyrrolo (1 '2': 3, 4)

imidazol e composto de quinolona-1,4- benzenodiol, 2,5-bis (1,1-dimetiletil) foram identificados.

Em todos os testes realizados no nosso estudo, a fração SM-F2 foi a que obteve melhores resultados como tratamento para a candidose, tanto em modelo invertebrado de *G. mellonella*, como no modelo experimental de camundongos imunossuprimidos. Na análise por CG-EM foram encontradas 2 substâncias que diferiram do grupo o qual não foi realizado o crescimento de *S. mutans*, ou seja nesse meio havia apenas o caldo BHI, que é o meio utilizado no crescimento de *S. mutans*. Dessa forma é possível descartar os compostos sem atividade, que foram extraídos do caldo, e encontrar as possíveis substâncias que estão tendo efeito inibitório. Encontramos o ácido nicotínico e triptofano, que possivelmente estariam agindo isoladamente ou em conjunto sobre o fungo.

O ácido nicotínico possui um grande potencial anti-inflamatório, sendo estudado para uso em tratamentos de doenças cardíacas (Kamanna, Kashyap, 2008). Também conhecido como niacina ou vitamina B3 é uma substância hidrossolúvel e que possui um papel importante no corpo humano. Possui papel na manutenção do equilíbrio da pele e sistema nervoso. O ácido nicotínico pode trazer diversos benefícios, sobretudo atividades antimicrobianas, como foi verificada por Daglia et al (1994), que encontraram efeito antagônico dessa substância isolada de café, sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Wurtele et al. (2010) encontraram sensibilidade à nicotinamida, que corresponde a amida do ácido nicotínico para um amplo espectro de espécies de fungos. Todos os isolados clínicos de *C. albicans* testados, incluindo cepas resistentes a azole e equinocandinas, foram sensíveis à nicotinamida. Isso é clinicamente importante porque, entre as numerosas espécies que causam candidose, *C. albicans* é a responsável pela maioria dos casos (Pfaller et al., 2010) e frequentemente desenvolve resistência aos azoles e equinocandinas (Perlin et al., 2007). Também foram testadas cepas de *Candida* não *albicans* que apresentaram vários graus de sensibilidade, como *C. krusei* que exibiram grande sensibilidade à nicotinamida, sendo interessante já que esta espécie é intrinsecamente resistente a muitas drogas antifúngicas (Pappas et al., 2009). Além disso, duas espécies diferentes de *Aspergillus*, *A. fumigatus* e *A. nidulans*, também foram sensíveis, o que é de grande importância já que *A. fumigatus* causa a segunda micose invasiva mais

comum em seres humanos (Dagenais et al., 2009). Esses dados suportam assim a hipótese de que o ácido nicotínico e seus derivados, como a nicotinamida, podem ser úteis para controlar várias infecções fúngicas e fornecer uma base para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

O triptofano que também foi encontrado na fração SM-F2 é um aminoácido requerido por todas as formas de vida para a síntese proteica e para outras funções metabólicas importantes, mas os animais não possuem a maquinaria enzimática capaz de sintetizá-la. Ao nível dos produtores primários, o triptofano é sintetizado a partir de moléculas como o fosfoenolpiruvato em bactérias, fungos e plantas, e estes organismos alimentam o fluxo de triptofano através da cadeia alimentar (Voet et al., 2013). Foram realizadas extensas pesquisas nas últimas décadas sobre o papel do metabolismo do triptofano no SNC em condições normais e patológicas (Raison et al., 2010; Lovelace et al., 2016; Blank et al., 2017), mas o papel do triptofano e seus metabólitos no sistema imune foram pouco examinados. Nos últimos anos, foi estabelecida uma associação direta entre catabolismo de triptofano e reações inflamatórias em uma vasta gama de doenças (Moffett et al., 2003).

Com a inoculação do extrato bruto, que obteve resultados similares à fração SM-F2 nas larvas e camundongos com candidose, houve melhora significativa na doença, evidenciada pelo aumento da sobrevivência das larvas e diminuição das lesões do dorso das línguas dos camundongos. Ao compararmos a identificação feita por CG-EM das substâncias presentes no extrato bruto com o extrato apenas do caldo, foi encontrada mais duas substâncias que podem estar relacionadas com seu efeito antifúngico, o ácido octanóico e a uridina.

O ácido octanóico, ou também denominado de ácido caprílico é um ácido de cadeia curta de 8 carbonos, naturalmente presente no leite materno, leite bovino e óleo de coco (Sprong et al., 2001; Jensen, 2002; Marina et al., 2009). Foram relatados efeitos antimicrobianos para o ácido protonado (ligação de um próton), provavelmente devido à sua capacidade de interagir com as porções lipofílicas das membranas das células microbianas e alterar a integridade da membrana celular (Pohl et al., 2011). No estado protonado, uma vez que esse ácido é uma molécula lipofílica pequena e não carregada, suas propriedades promovem a rápida penetração no biofilme e intercalação nas membranas celulares microbianas. No estudo de Rosenblatt et al. (2017) foi demonstrado erradicação completa de

biofilmes em um período de 60 min com ácidos caprílico e poligalacturônico isolados e em associação, contra biofilmes de patógenos infecciosos hospitalares e de base alimentar (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*). As combinações também inibiram sinergicamente o crescimento de micro-organismos planctônicos. Foi avaliada toxicidade da combinação em testes *in vitro* em fibroblastos, o que não evidenciou respostas citotóxicas.

O ácido caprílico pode tornar-se ionizado (desprotonado) quando o pH aumenta acima de 4,8 (de Gomes et al., 2011), numa formulação tópica o ácido caprílico protonado, que retém a atividade antimicrobiana, pode estar presente mantendo um pH abaixo desse valor. Isso está dentro da faixa de pH natural observada na pele humana (Lambers et al., 2006) e já foi verificado que feridas dérmicas exibem cicatrização melhorada em pHs ácidos (Schreml et al., 2010). O mel que tem pH entre 3,2-4,2 (Pieper, 2009), foi aplicado diretamente e usado no tratamento de feridas, alguns ensaios clínicos relataram um aprimoramento da cicatrização (Lee et al., 2011). A cicatrização de feridas também já foi relatada como auxiliada pela presença de ácido caprílico (Srivastava e Durgaprasad, 2008).

A uridina e seus derivados nucleotídicos desempenham um papel importante nos processos bioquímicos e fisiológicos, incluindo a síntese de DNA, RNA, componentes da membrana e glicosilação (Fan et al., 2017). Além disso, a uridina tem sido cada vez mais utilizada como precursora de drogas antitumorais e antivirais na indústria farmacêutica (Cheng et al., 2016).

Algumas das substâncias encontradas na SM-F1 também já possuem efeitos antimicrobianos descritos na literatura. As substâncias contidas apenas nessa fração foram: ácido propanóico, (3R)-3-Methyl-1,4-bis(trimethylsilyl)piperazine-2,5-dione, pirimidina, gulose e oleamida. O ácido propanóico conhecido usualmente como ácido propiônico ou ácido propílico inibiu o crescimento de *S. aureus* USA300 por uma diminuição no pH intracelular, também exerceu atividades antimicrobianas contra *C. albicans* e *E. coli* (Wang et al., 2014). As pirimidinas ocupam um lugar distinto e único na química medicinal devido à sua presença em diversos produtos naturais biologicamente ativos. Com vista a atividades biológicas de amplo espectro, como atividades antialérgicas, antitumorais, anti-inflamatórias e antiparasitário. Além disso, as pirimidinas são potenciais

inibidores da diidrofolato redutase (DHFR), um alvo promissor de drogas para o desenvolvimento de agentes anti-infecciosos (Desai et al., 2014). A oleamida possui ação no sono, e em outras atividades neurológicas, incluindo regulação de processos de memória, diminuição da temperatura corporal e atividade locomotora; estimulando a liberação de Ca^{++} , modulação ou ativação de receptores e efeito na percepção de dor (Hamed et al., 2015).

Até o momento não há nenhum estudo na literatura que avaliou o efeito do extrato bruto e frações obtidas a partir da cultura de *S. mutans* em modelo experimental invertebrado e de camundongos. O presente trabalho relata dados inéditos, demonstrando que o extrato e frações exercem atividade terapêutica contra infecções causadas por *C. albicans*, aumentando dessa forma o tempo de sobrevivência das larvas e melhorando as lesões dos camundongos. Esse trabalho também identificou substâncias presentes no extrato bruto e nas frações SM-F1 e SM-F2 como possíveis agentes antifúngicos. Esses resultados certamente contribuirão para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a candidose, estimulando assim o isolamento dessas substâncias, o que pode futuramente levar ao desenvolvimento de novas drogas terapêuticas para infecções fúngicas.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados que foram obtidos nesse trabalho, concluiu-se que:

- O extrato bruto do sobrenadante da cultura de *S. mutans* não teve ação profilática em modelo de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*;
- O extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2 exerceram efeito terapêutico na candidose experimental em modelo de *G. mellonella* e camundongos imunossuprimidos;
- O extrato bruto e fração SM-F2 apresentaram efeito inibitório sobre *C. albicans*, demonstrado nas reduções de UFC/mL tanto no modelo de *G. mellonella* quanto na recuperação de *C. albicans* na candidose em camundongo;
- O maior efeito terapêutico na candidose experimental em ambos os modelos estudados foi para a fração SM-F2;
- Foram identificados no extrato bruto as substâncias ácido octanóico e a uridina, e na fração SM-F2 o ácido nicotínico e triptofano.

REFERÊNCIAS*

Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(9):1378-83.

Astvad KMT, Meletiadis J, Whalley S, Arendrup MC. Fluconazole pharmacokinetics in *Galleria mellonella* larvae and performance evaluation of a bioassay compared to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for hemolymph specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(10):895-17.

Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect Immun*. 2009;77:3696–704.

Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SFG, de Alvarenga JA, Velloso MdS, Prata MCdA, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS ONE*. 2016;11(3):150457. doi:10.1371/journal.pone.0150457

Barua DR, Basavanna JM, Varghese RK. Efficacy of Neem extract and three antimicrobial agents incorporated into tissue conditioner in inhibiting the growth of *C. albicans* and *S. mutans*. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(5):97-101.

Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect*. 2003;5(15):1389-95.

Blank T, Prinz M. Type I interferon pathway in CNS homeostasis and neurological disorders. *Glia*. 2017;65(9):1397-406. doi: 10.1002/glia.23154.

Borghi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. *Future Microbiol*. 2014;9(2):163-73.

Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011;45:69-86. <http://dx.doi.org/10.1159/000324598>.

Cheng KG, Su CH, Huang JY, Liu J, Zheng YT, Chen ZF. Conjugation of uridine with oleanolic acid derivatives as potential antitumor agents. *Chem Biol Drug Des*. 2016;88(3):329-40.

Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2013;81:189–200.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):447-65.
- Daglia M; Cuzzoni MT, Dacarro C. Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. *J Agric Food Chem.* 1994;42(10):2273–7.
- Davis-Hanna A, Piispanen AE, Stateva LI, Hogan DA. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signaling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular Microbiol.* 2008;67(1):47–62.
- Desai NC, Kotadiya GM, Trivedi AR. Studies on molecular properties prediction, antitubercular and antimicrobial activities of novel quinoline based pyrimidine motifs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(14):3126-30.
- Dhamgaye S, Qu Y, Peleg AY. Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cell Microbiol.* 2016;18(12): 1716-22.
- Dundar H, Brede DA, La Rosa SL, El-Gendy AO, Diep DB, Nes IF. The *fsr* quorum-sensing system and cognate gelatinase orchestrate the expression and processing of Proprotein EF_1097 into the mature antimicrobial peptide enterocin O16. *J Bacteriol.* 2015;197(13):2112-21.
- Dutton LC, Nobbs AH, Jepson K, Jepson MA, Vickerman MM, Alawfi SA et al. O-mannosylation in *Candida albicans* enables development of interkingdom biofilm communities. *M Bio.* 2014;5(2):911-14.
- Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014;82(5):1968-81.
- Fan X, Wu H, Li G, Yuan H, Zhang H, Li Y, et al. Improvement of uridine production of *Bacillus subtilis* by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176545>
- Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010;89(1):8-18.
- Fox EP, Cowley ES, Nobile CJ, Hartooni N, Newman DK, Johnson AD. Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Curr Biol.*2014;24(20):2411-6.
- Fuchs BB, O'brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence.* 2010;1(6):475-82.
- Fuchs BB, Li Y, Li D, Johnston T, Hendricks G, Li G, Rajamuthiah R, Mylonakis E. Micafungin elicits an immunomodulatory effect in *Galleria mellonella* and mice. *Mycopathologia.* 2016;181(1-2):17-25.

Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(17):4507-4512.

Gomes PS, Figueiral MH, Fernandes MH, Scully C. Cytotoxicity of denture adhesives. *Clin Oral Investig*. 2011;15(6):885-93. doi: 10.1007/s00784-010-0464-0

Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI et al. Role of glucosyltransferase B in the interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and experimental pellicle formed on hydroxyapatite surface. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6357-67.

Hamed AOA, Ayoub SMH. Chemical composition and antimicrobial activity of Sudanese *Lupinus termis* L. root extracts. *The Pharma Innovation*. 2015;4(5):1-4.

Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol*. 2004;54(5):1212-23.

Jarosz LM, Deng DM, Van Der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*. 2009;8(11):1658-64.

Jensen RG. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci*. 2002;85(2):295-350.

Joyner PM, Liu J, Zhang Z, Merritt J, Qi F, Cichewicz RH. Mutanobactin A from the human oral pathogen *Streptococcus mutans* is a cross-kingdom regulator of the yeast-mycelium transition. *Org Biomol Chem*. 2010;8(24):5486-9.

Junior JC, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC microbiology*. 2013;13(1):217.

Junqueira JC, Colombo CED, Martins JS, Koga-Ito CY, Carvalho YR, Jorge AOC. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiol Immunol*. 2005;49(3):199-207.

Junqueira JC. Models hosts for the study of oral candidiasis. *Adv Exp Med Biol*. 2012;710:95-105. doi.org/10.1007/978-1-4419-5638-5_10

Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol*. 2008;101(8A):20-6.

Kamiya RU, Taiete T, Gonçalves RB. Mutacins of *Streptococcus mutans*. *Braz J Microbiol*. 2011;42(4):1248-58

Katragkou A, Kruhlak MJ, Simitsopoulou M, Chatzimoschou A, Taparkou A, Cotton CJ et al. Interactions between human phagocytes and *C albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. *J Infect Dis.* 2010;201(12):1941-9.

Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* 2011; 45(2):100-6.

Kreth J, Merritt J, Zhu L, Shi W, Qi F. Cell density and ComE-dependent expression of a group of mutacin and mutacin-like genes in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;265(1):11-7.

Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci.* 2006;28(5):359–70. doi:10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x

Laprade DJ, Brown MS, McCarthy ML, Ritch JJ, Austriaco N. Filamentation protects *Candida albicans* from amphotericin B-induced programmed cell death via a mechanism involving the yeast metacaspase, MCA1. *Microb Cell.* 2017;3(7)285-92. doi: 10.15698/mic2016.07.512

Lee DS, Sinno S, Khachemoune A. Honey and wound healing: an overview. *Am J Clin Dermatol.* 2011;12(3):181-90. doi:10.2165/11538930-000000000-00000

Leroy O, Bailly S, Gangneux JP, Mira JP, Devos P, Dupont H et al. Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care.* 2016;6(1):2. doi: 10.1186/s13613-015-0103-7.

Liu S, Qiu W, Zhang K, Zhou X, Ren B, He J et al. Nicotine enhances interspecies relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7953920.

Lovelace MD, Varney B, Sundaram G, Franco NF, Ng ML, Pai S. Current evidence for a role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2016;7:246. doi:10.3389/fimmu.2016.00246.

Marina AM, Che Man YB, Nazimah SAH, Amin I. Chemical properties of virgin coconut oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2009;86(4):301-7. doi:10.1007/s11746-009-1351-1

Martins JS, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CED et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111(1):71-7.

Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell.* 2007;6(12):2429-36.

McKenzie CGJ, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN et al. Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun*. 2010;78(4):1650-8.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003616. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>

Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(4):247-65.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005;73(7):3842-50.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia*. 2008;165(1):1-3.

Nagasawa R, Sato T, Senpuku H. Raffinose induces biofilm formation by *Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(15):869-17.

Nicolas GG, La Pointe G, Lavoie MC. Production, purification, sequencing and activity spectra of mutacins D-123.1 and F-59 1. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):69.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48(5):503-35. doi: 10.1086/596757.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):340-9.

Pellatti F, Benvenuti S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in citrus aurantium. *J Chromatogr A*. 2007;1161(1-2):71-88.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM et al. The effect of *S. mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008;53(8):755-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.02.015>

Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat*. 2007;10(3):121-30.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1366-77. doi: 10.1128/JCM.02117-09.

Pieper B. Honey-based dressings and wound care: an option for care in the United States. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2009;36(1):60-6. doi:10.1097/01.WON.0000345177.58740.7d

Pierce CG, Chaturvedi AK, Lazzell AL, Powell AT, Saville SP, McHardy SF et al. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. *NPJ biofilms and microbiomes.* 2015;1:15012. doi:10.1038/npjbiofilms.2015.12.

Pierce CG, Srinivasan A, Uppuluri P, Ramasubramanian AK, Lopez-Ribot JL. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(5):726-30.

Pohl C, Kock J, Thibane V. Antifungal free fatty acids: a review [Internet]. 2011 [acesso em 2018 Jan 17]; [aproximadamente 11 p.]. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Carolina_Pohl/publication/266463207_Antifungal_free_fatty_acids_A_Review/links/54daf14b0cf261ce15ce9643.pdf

Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, Vogt G. CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN- α : relationship to CNS immune responses and depression. *Mol Psychiatry.* 2010;15(4):393-403.

Rosenblatt J, Reitzel R, Vargas N, Chaftari AM, Hachem RY, Raad I. Caprylic and polygalacturonic acid combinations for eradication of microbial organisms embedded in biofilm. *Front Microbiol.* 2017;8:1999.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, dos Santos JD, de Barros PP, de Azevedo Prata MC et al. Competitive Interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PloS one.* 2015;10(7):e0131700.

Rossoni RD, Fuchs BB, de Barros PP, Velloso MD, Jorge AO, Junqueira JC et al. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173332. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0173332>.

Sadowska B, Walencka E, Wieckowska-Szakiel M, Różalska B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 2010;55(5):497-501.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:398-429. doi. org/10.1128/CMR.14.2.398-429.2001

Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* 2003;2(5):1053-60.

Schreml S, Szeimies RM, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24(4):373-8. doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03413.x

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(2):213-67.

Sprong RC, Hulstein MFE, Van der Meer R. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(4):1298-301.

Srivastava P, Durgaprasad S. Burn wound healing property of *Cocos nucifera*: an appraisal. *Indian J Pharmacol*. 2008;40(4):144-6. doi:10.4103/0253-7613.43159

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317-24.

Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, Abe S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003;47(5):321-6.

Thein ZN, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses*. 2009;52(6):467-75.

Tomaz PRU. Desenvolvimento e validação de método de análise por cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO₂ atmosférico na composição de metabólitos polares de cana-de-açúcar [Dissertação]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química; 2011.

Vilcinskas A. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects. *Virulence*. 2010;1(3):206-14.

Voet D, Voet JG. *Bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.

Wahaab F, Subramaniam K. Bioprospecting marine actinomycetes for multidrug-resistant pathogen control from Rameswaram coastal area, Tamil Nadu, India. *Arch Microbiol*. 2018;200(1):57-71.

Walencka E, Rózalska S, Sadowska B, Rózalska B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol*. 2008;53(1):61-6.

Wong JH, Ng TB, Hui M, Cheung RCF, Chan YS, Dan X et al. Screening of aqueous and organic extracts from a variety of fungi for their ability to antagonise the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Hong Kong Med J*. 2016, 22(6)Suppl 7.

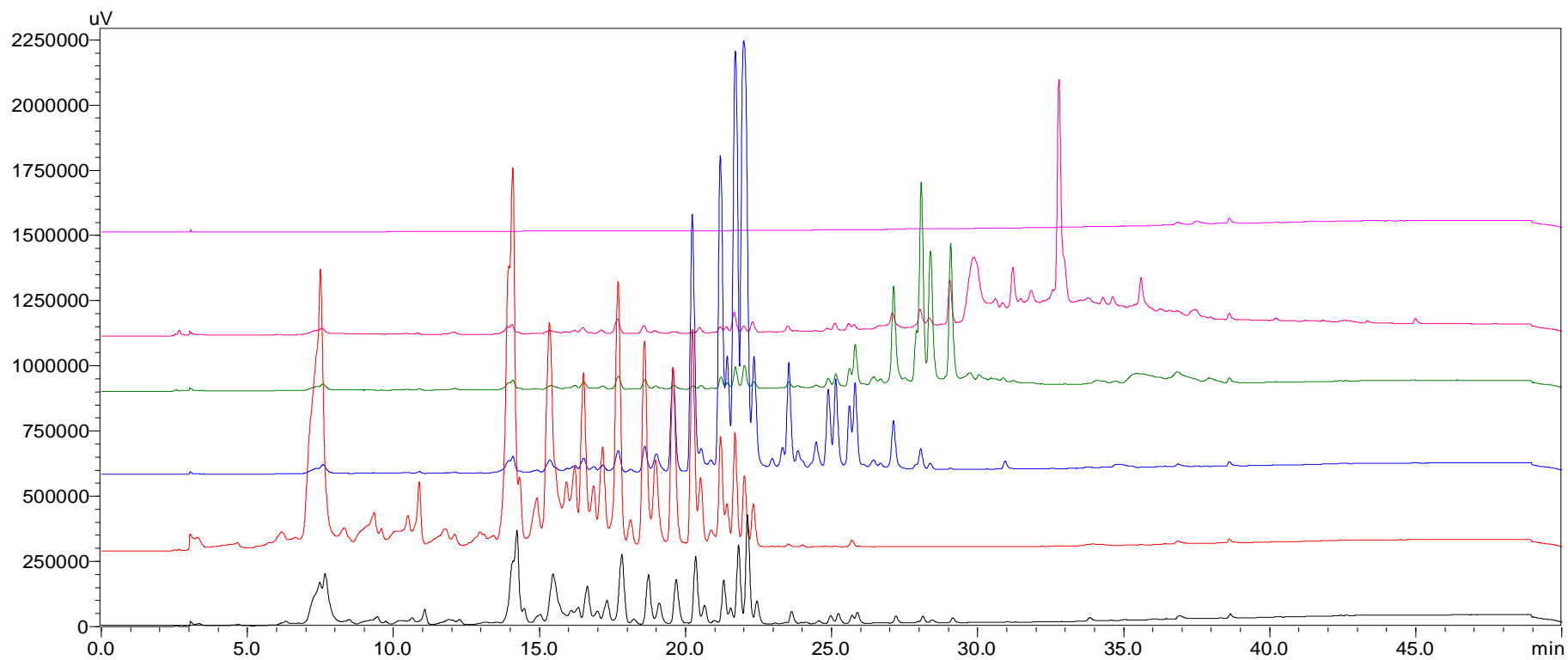
Woolford CA, Lagree K, Aleynikov T, Mitchell AP. Negative control of *Candida albicans* filamentation-associated gene expression by essential protein kinase gene KIN28. *Curr Genet*. 2017;63(6):1073-9.

Wurtele H, Tsao S, Lépine G, Mullick A, Tremblay J, Drogaris P. Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy. *Nat Med*. 2010;16(7):774-80.

Wang Y, Dai A, Huang S, Kuo S, Shu M, Tapia CP. Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Benef Microbes*. 2014;5(2):161-8.

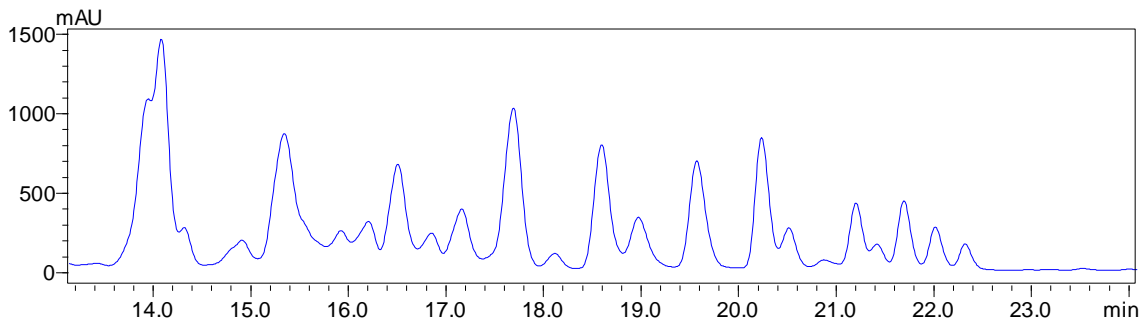
APÊNDICE A - Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Figura 3 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD das frações SM-EB (preto), SM-F1 (vermelho), SM-F2 (azul), SM-F3 (verde), SM-F4 (rosa), SM-F5 (pink)



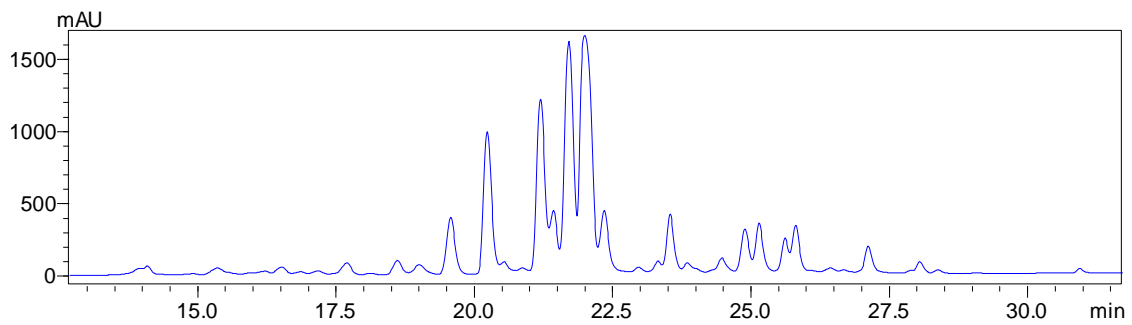
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F1



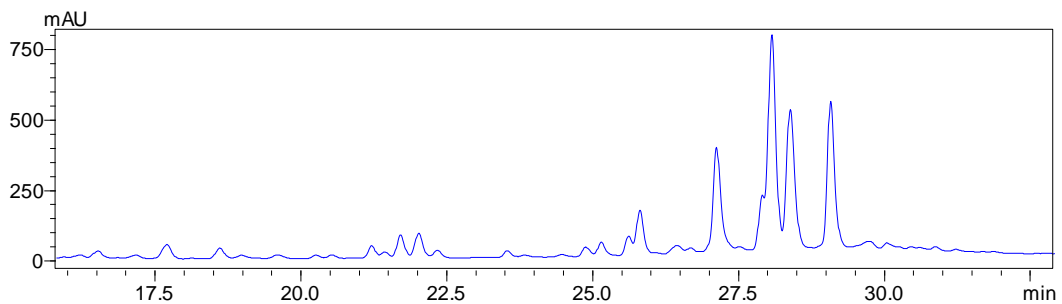
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F2



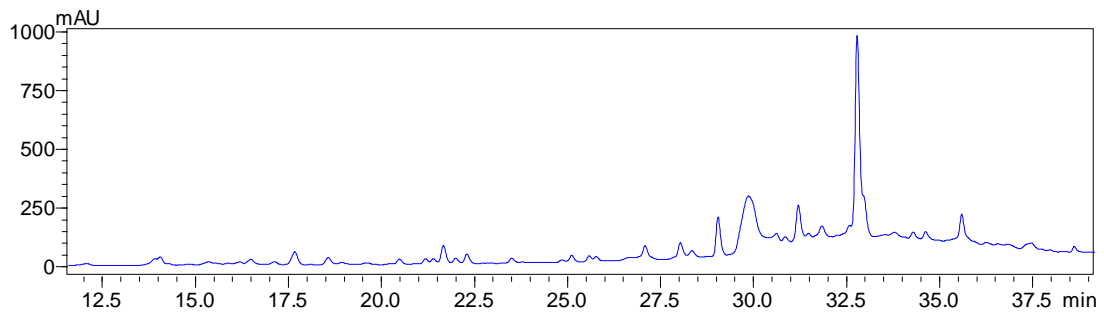
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F3



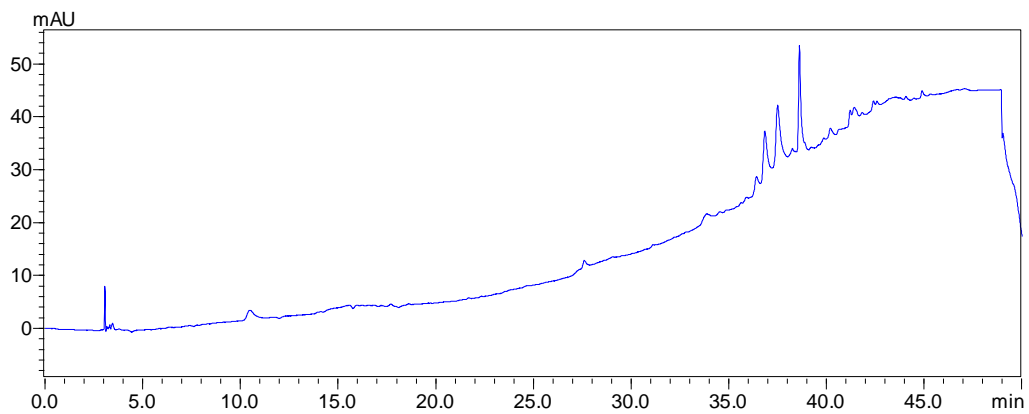
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F4



Fonte: Elaborado pelo autor.

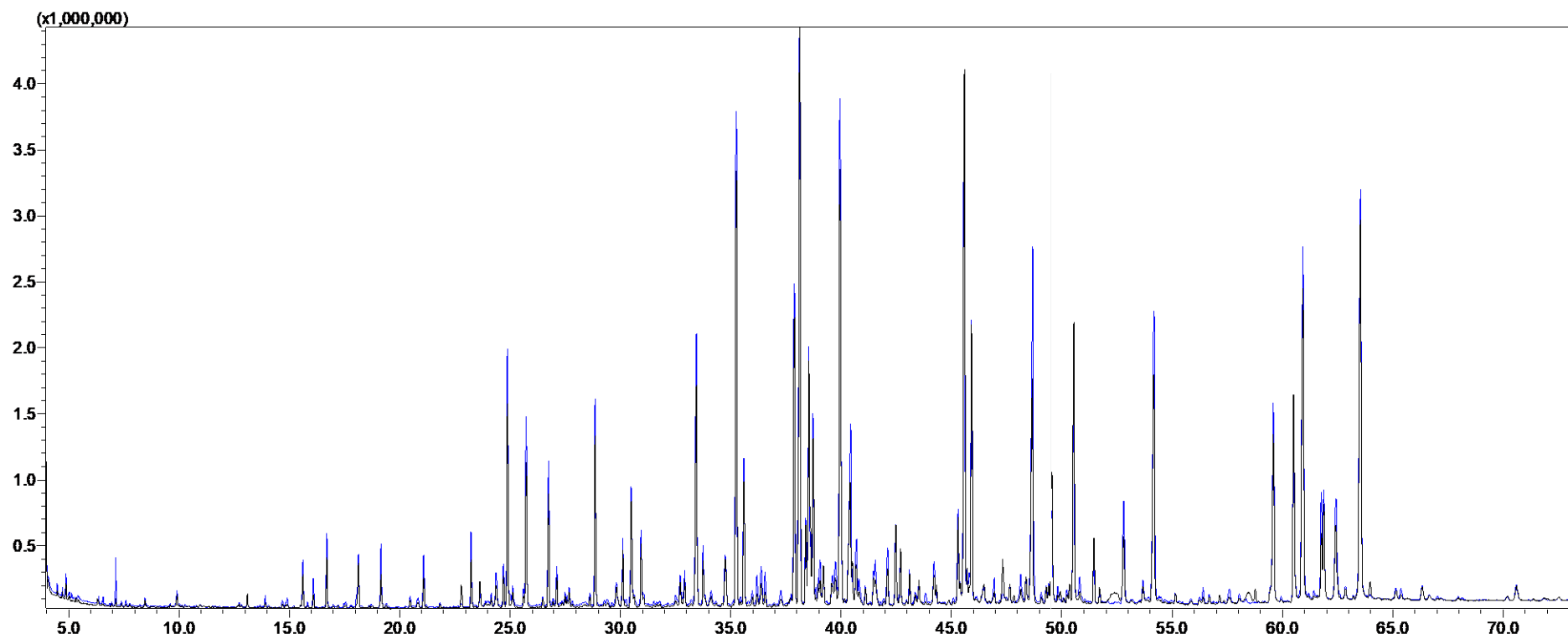
Figura 8 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F5



Fonte: Elaborado pelo autor.

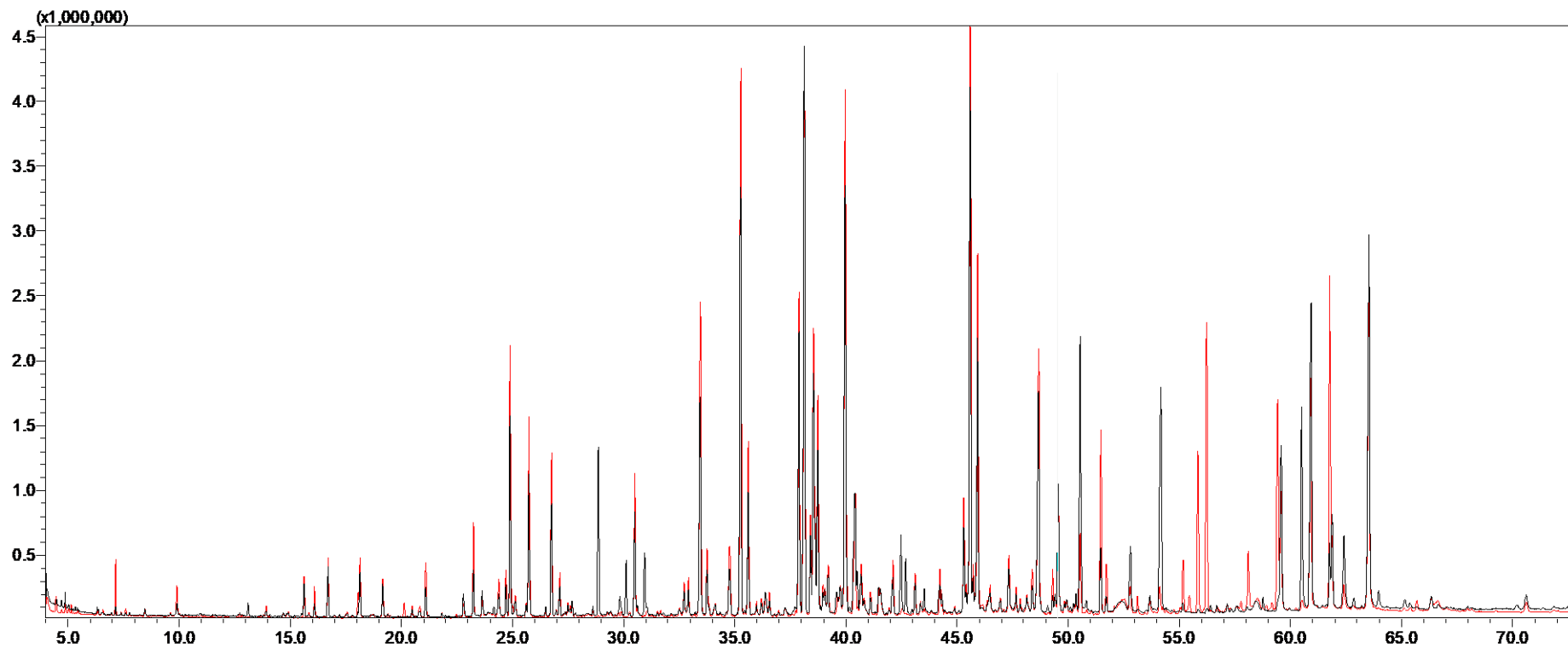
APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Figura 10 - Cromatograma obtido por CG-EM do SM-EB (azul) e controle (preto)



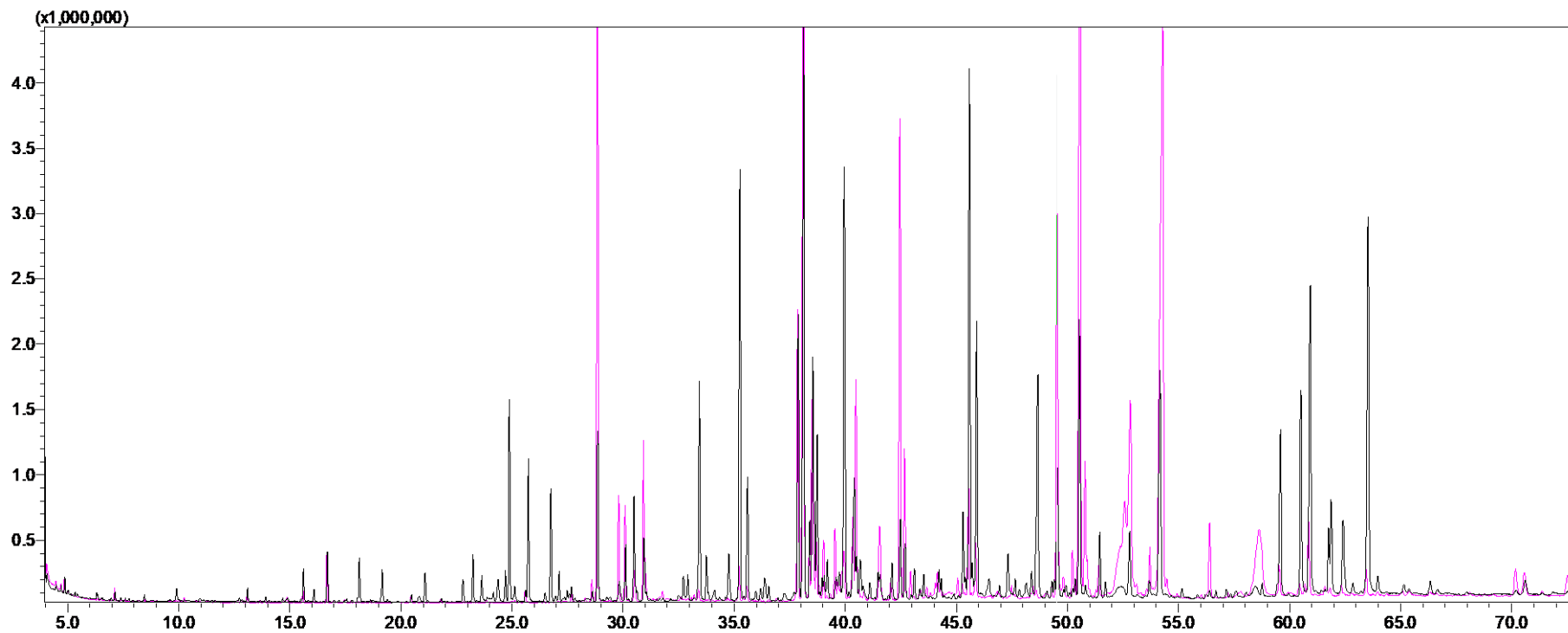
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F1 (vermelho) e controle (preto).



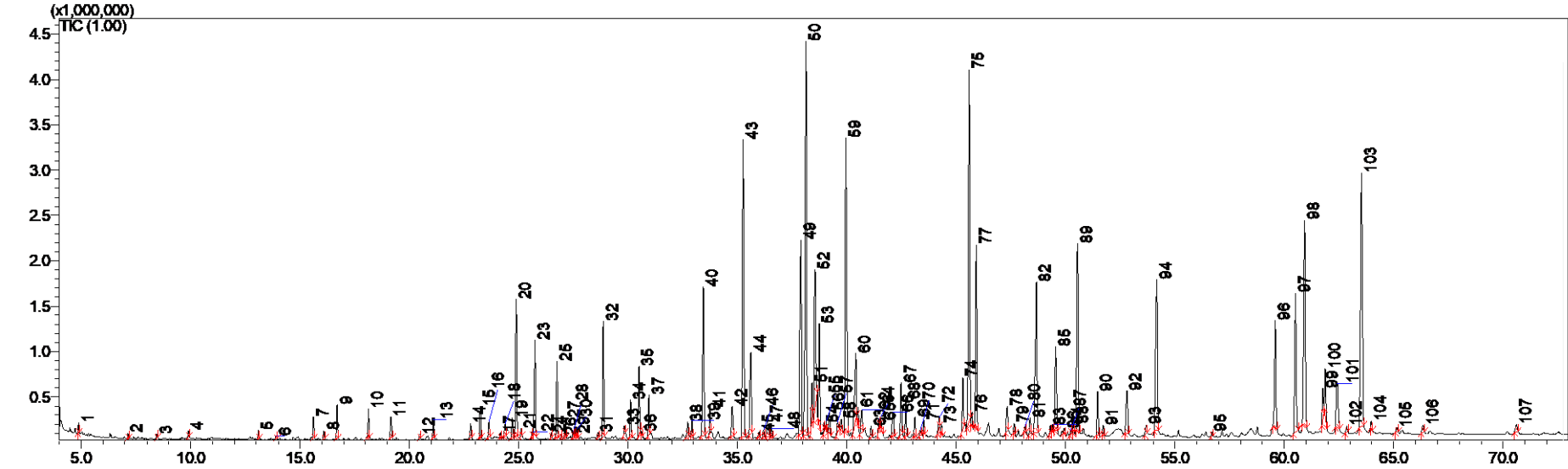
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F2 (rosa) e controle (preto).



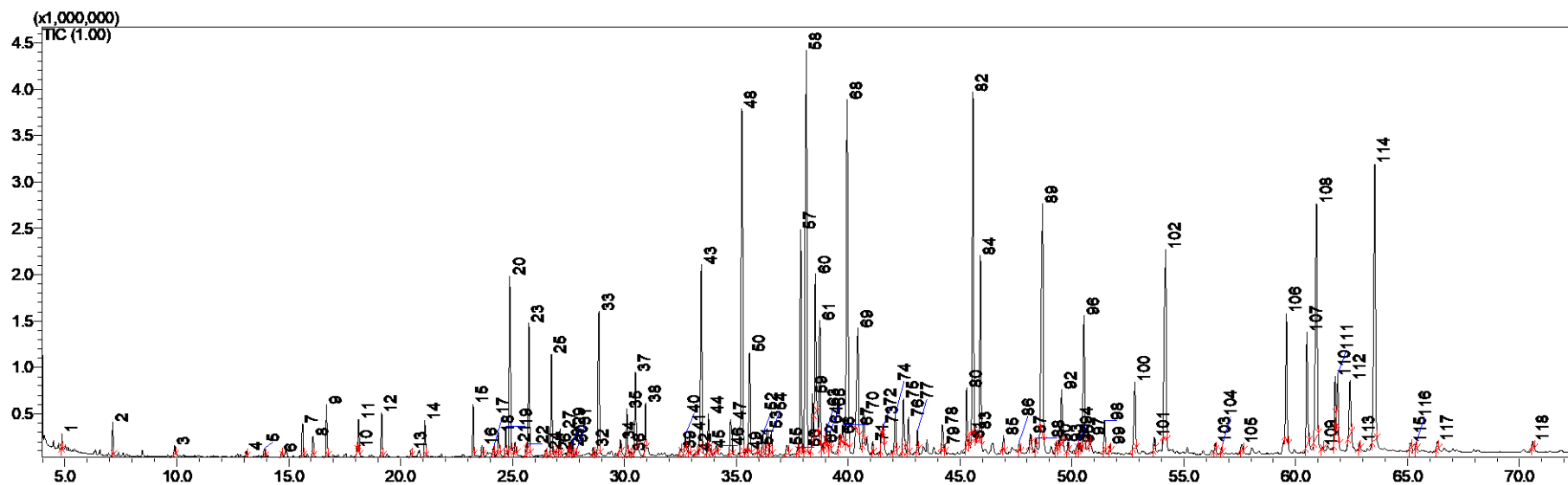
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Cromatograma obtido por CG-EM do controle.



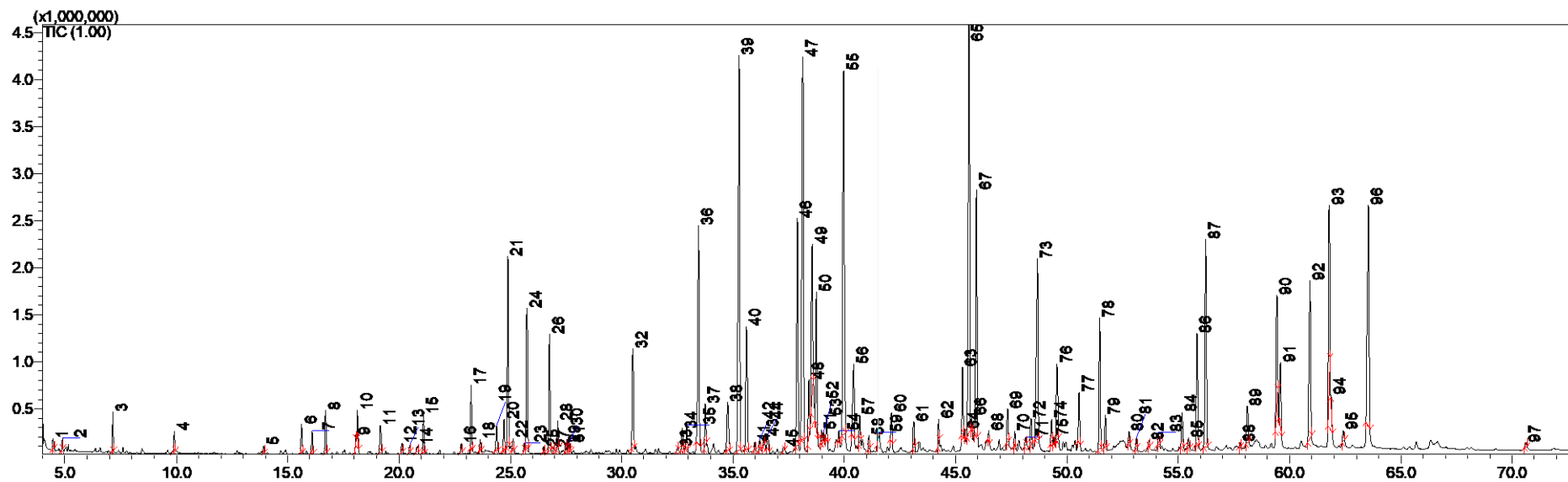
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Cromatograma obtido por CG-EM de SM-EB.



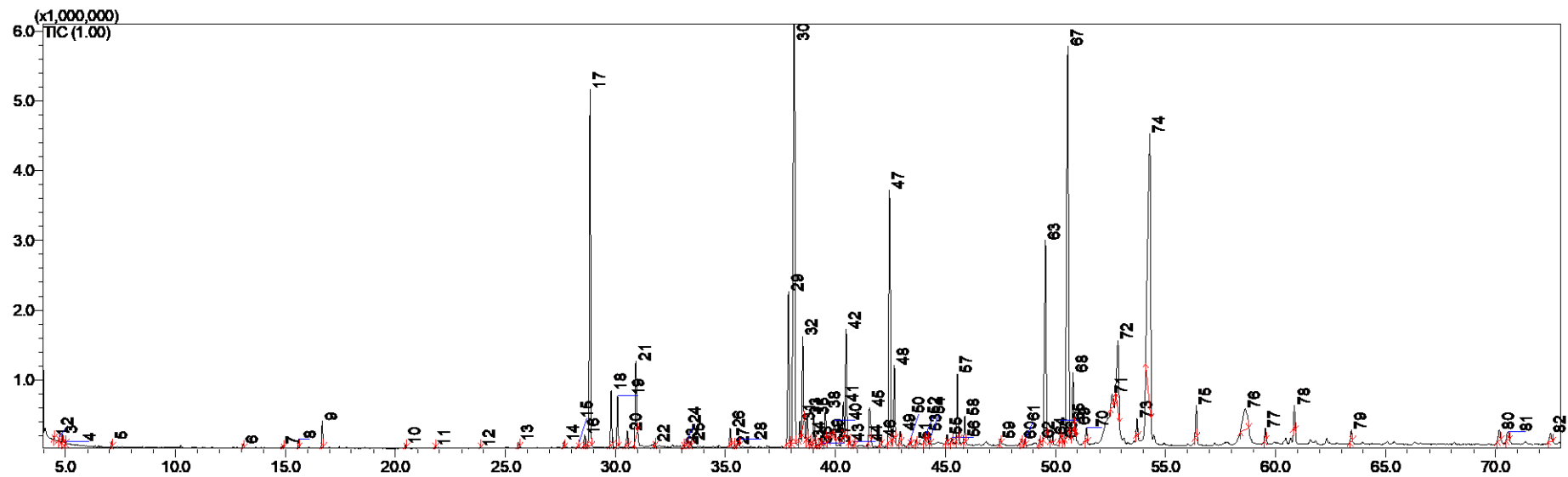
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F1



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F2



Fonte: Elaborado pelo autor.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "**Atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos por Streptococcus mutans sobre Candida albicans em modelos de estudo in vivo**" registrada com o nº **005 /2016-CEUA-ICT-UNESP**, sob a responsabilidade de **JÉSSICA DIANE DOS SANTOS**, tendo como colaborador **Felipe de Camargo Ribeiro** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 13/05/2016.

Finalidade	(<input type="checkbox"/>) Ensino (<input checked="" type="checkbox"/>) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/10/2016 a 30/09/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongos/heterogênico Swiss
Nº de Animais	40
Peso/Idade	30 grs / 60 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 13 de maio de 2016


Prof. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício