

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

15/01/2020



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.

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.

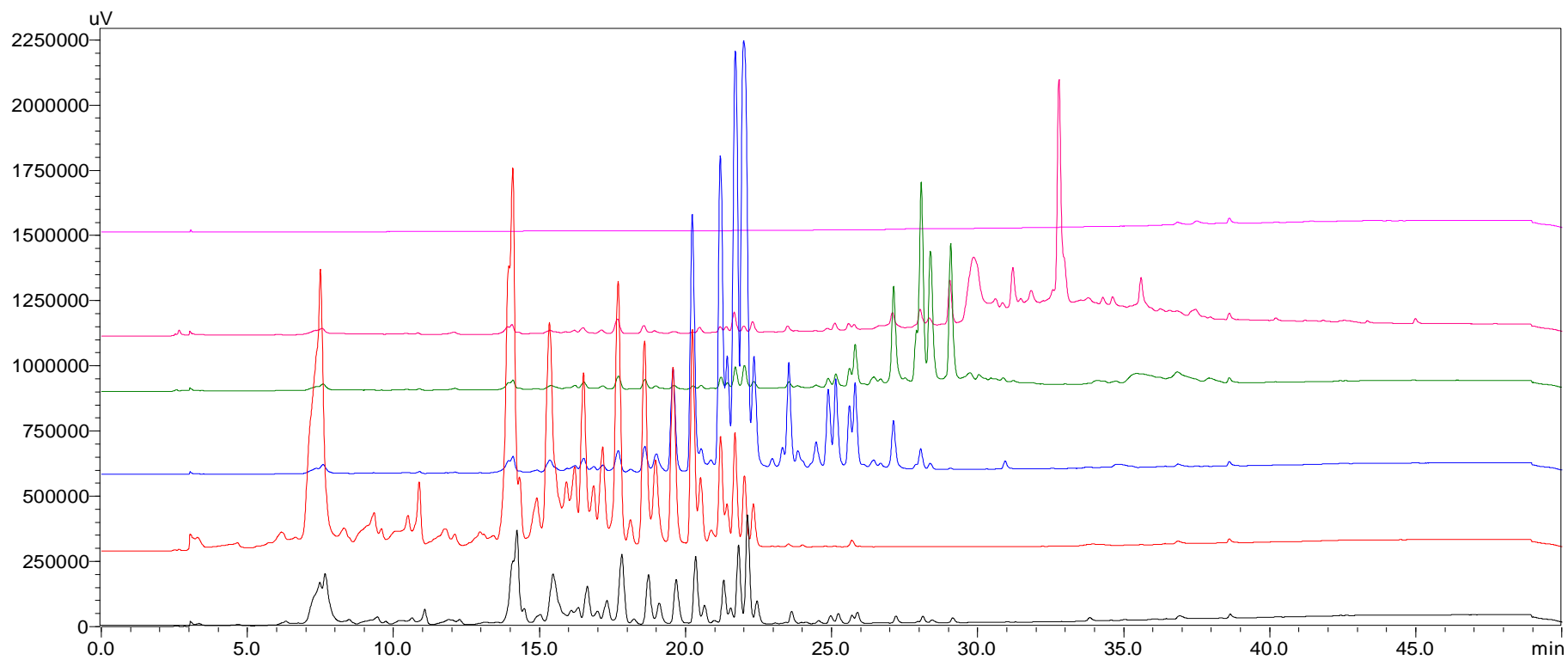
Woolford CA, Lagree K, Aleynikov T, Mitchell AP. Negative control of *Candida albicans* filamentation-associated gene expression by essential protein kinase gene KIN28. *Curr Genet*. 2017;63(6):1073-9.

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.

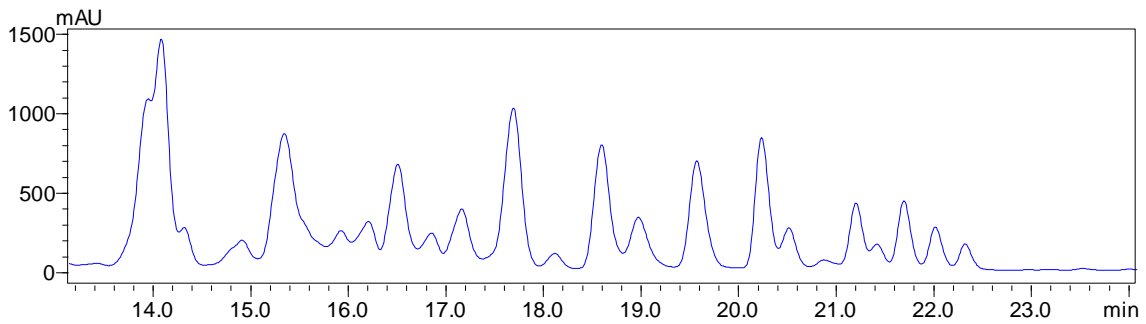
APÊNDICE A - Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

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)



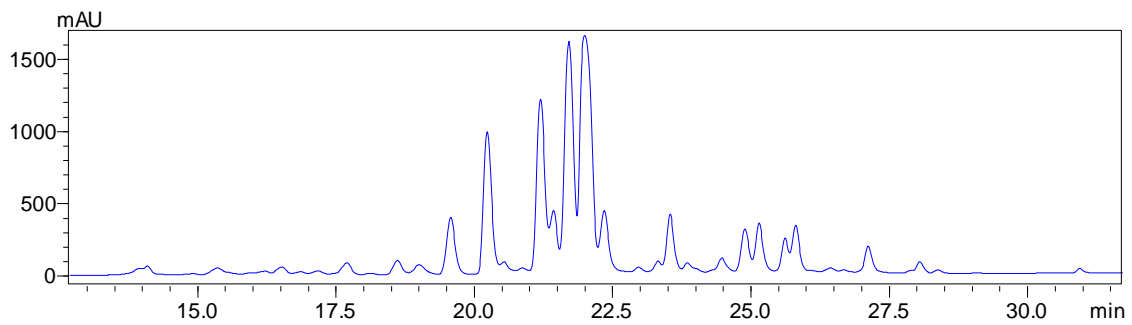
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



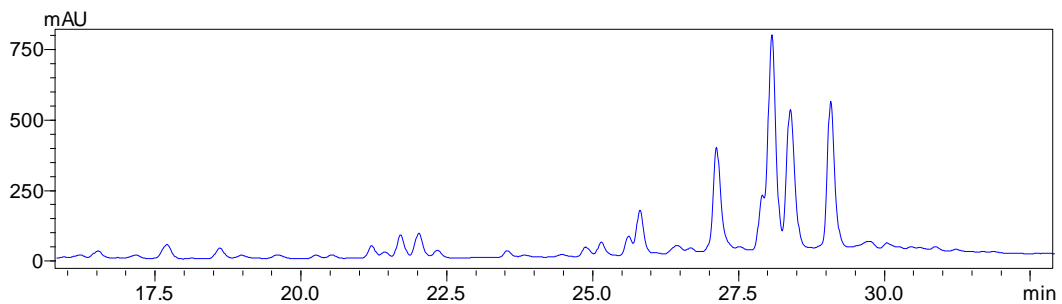
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



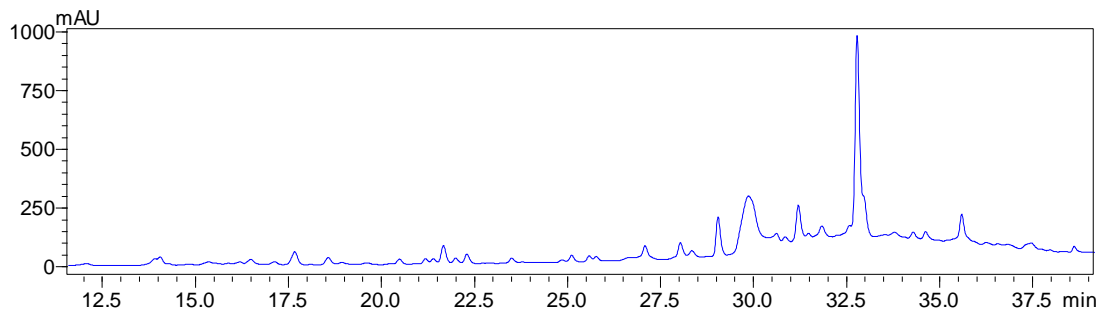
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



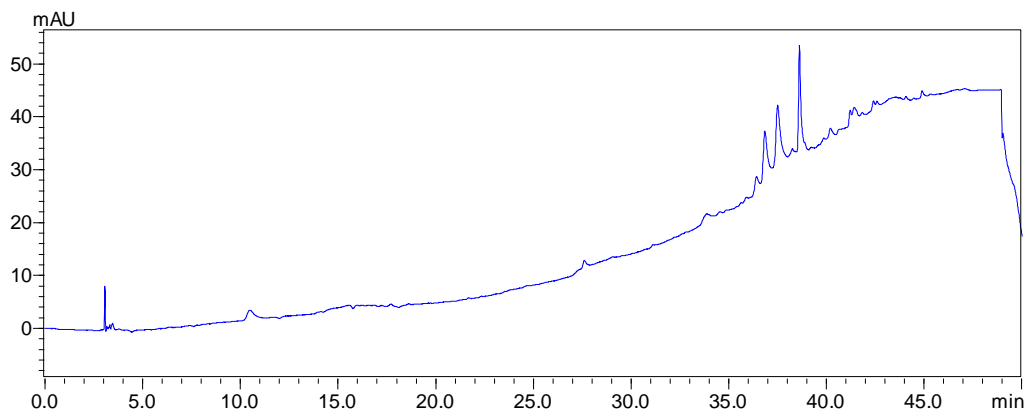
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

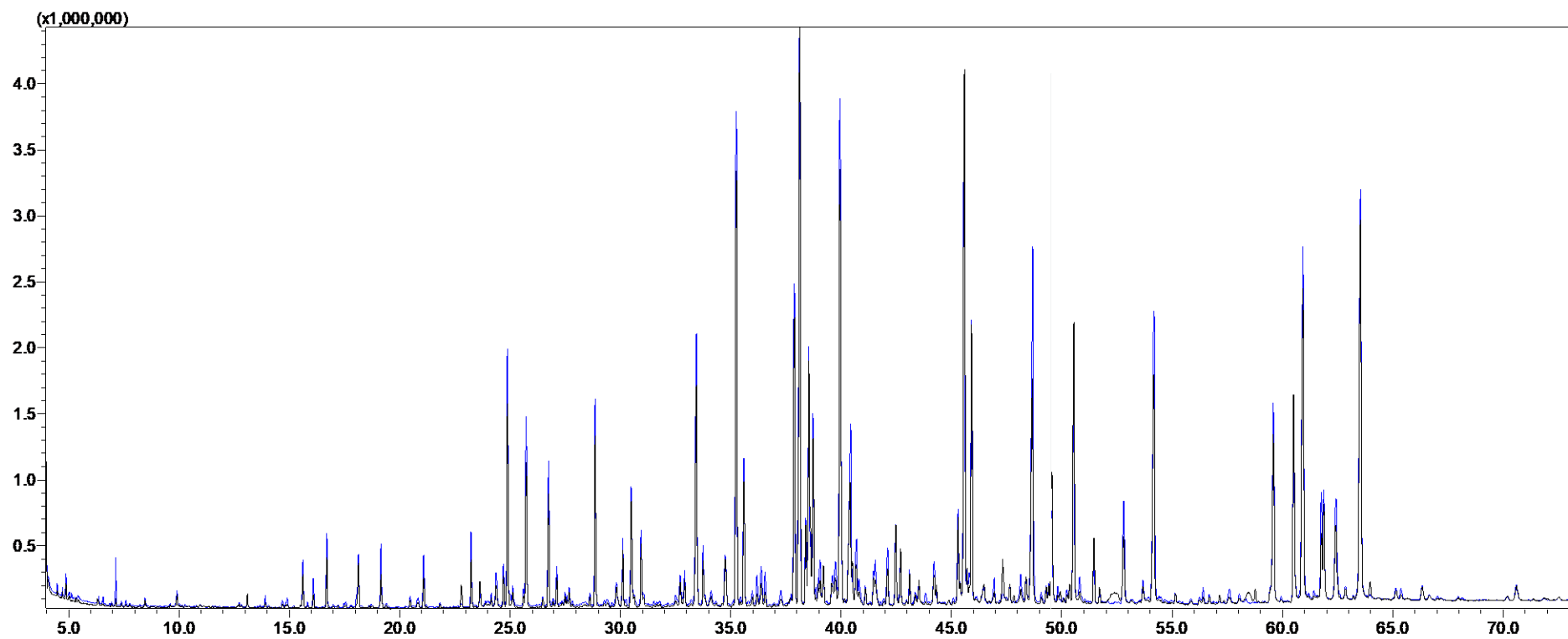
Figura 8 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F5



Fonte: Elaborado pelo autor.

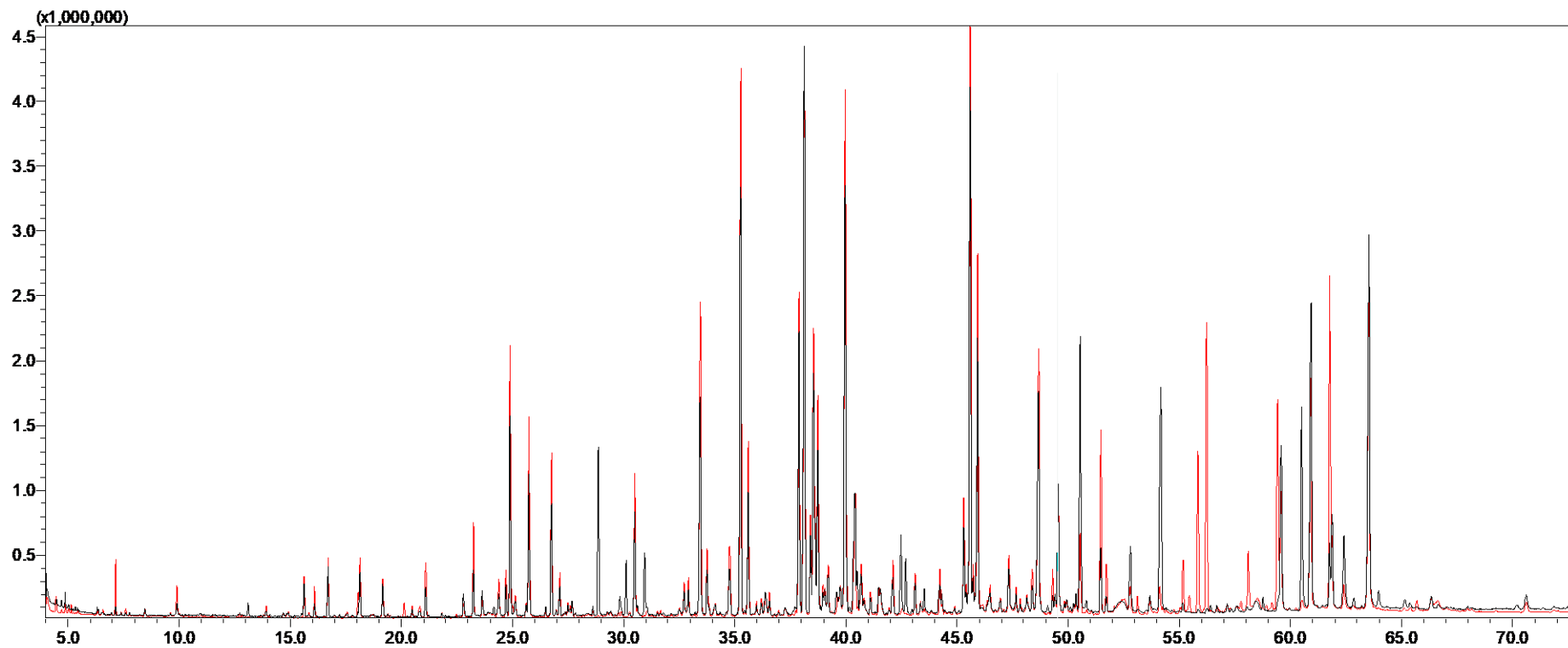
APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

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



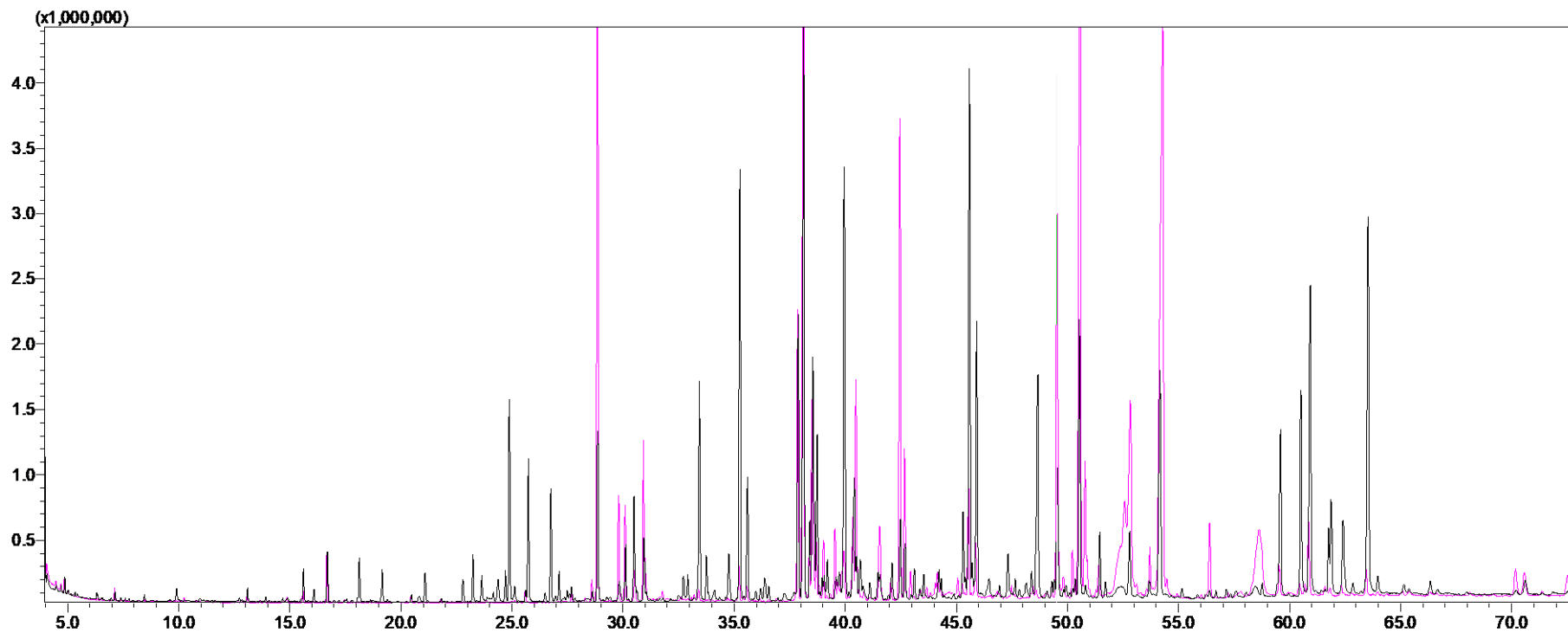
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



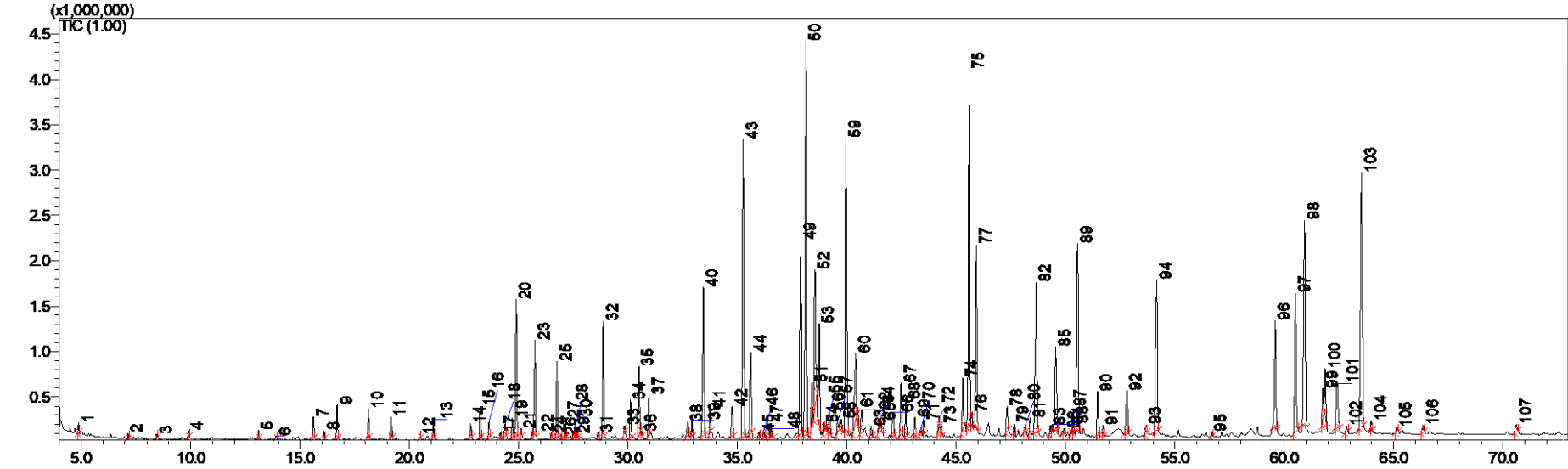
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



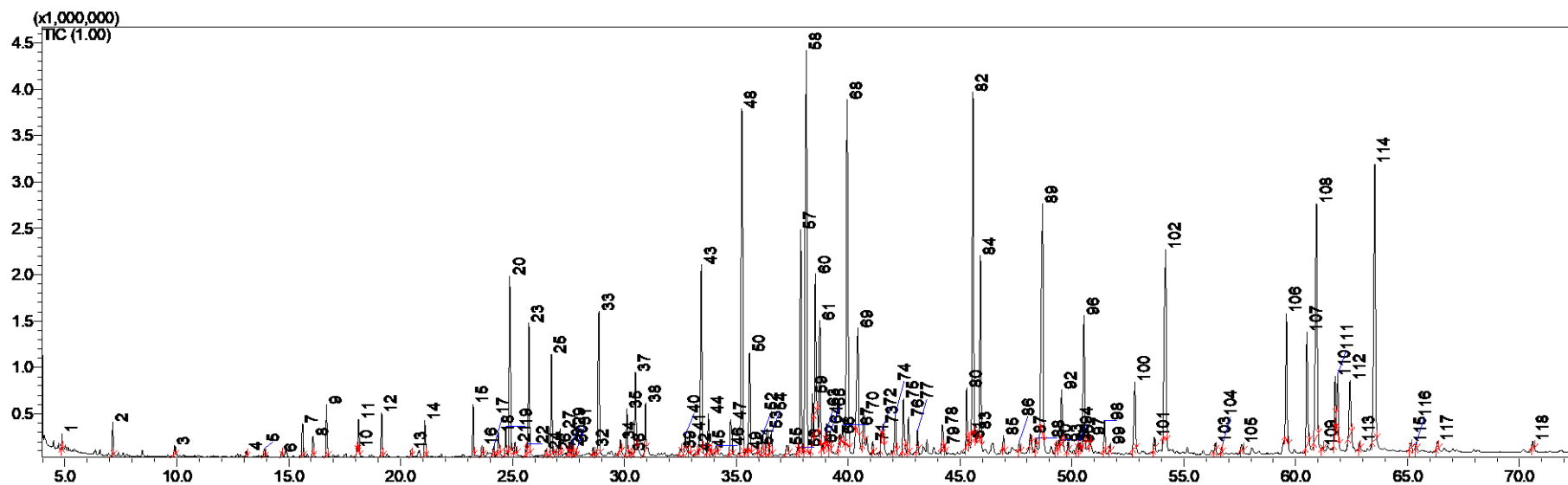
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



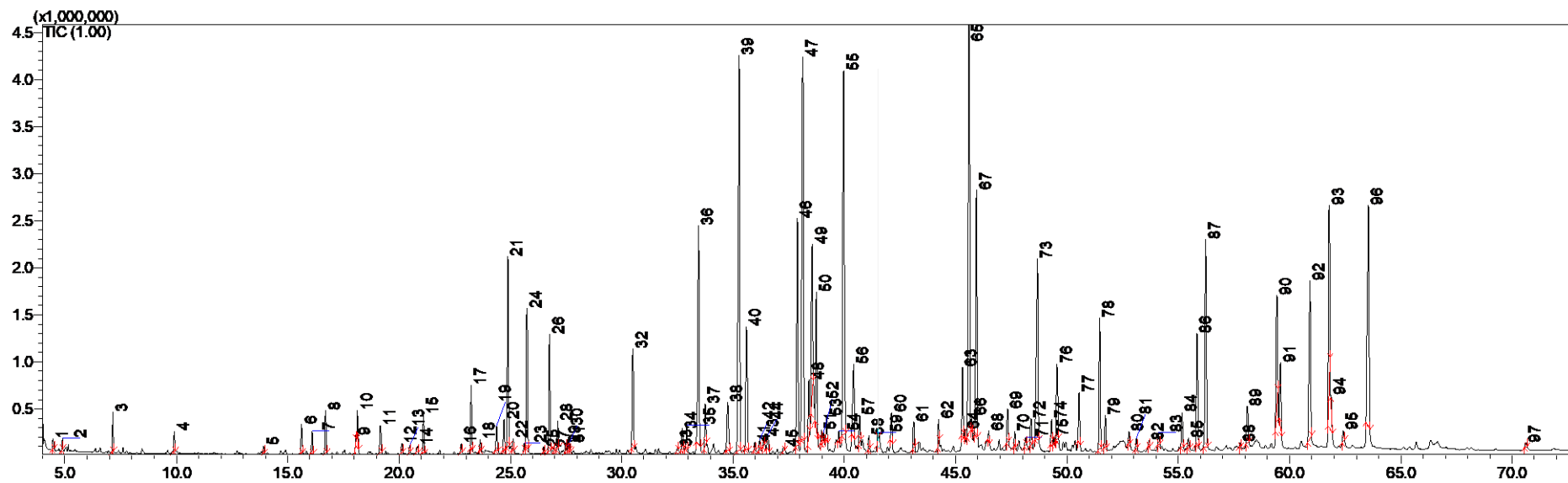
Fonte: Elaborado pelo autor.

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



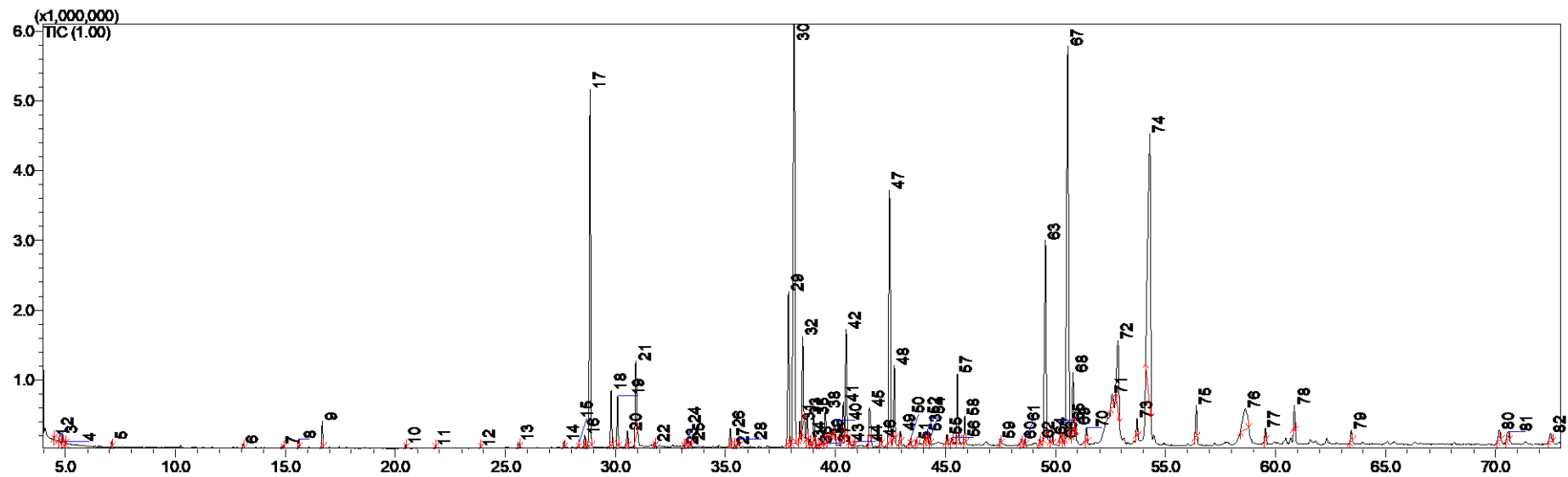
Fonte: Elaborado pelo autor.

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