



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 019528 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DO SOBRENADANTE DE S. MUTANS E USO DO EXTRATO E FRAÇÕES DO SOBRENADANTE DE S. MUTANS COMO ANTIFÚNGICO

Resumo: A presente invenção refere-se a um método de obtenção de extrato bruto e frações de sobrenadante da cultura de S. mutans com atividade inibitória sobre C. albicans. Dito método revelou ser eficaz na extração, fracionamento e identificação das substâncias produzidas por S. mutans. Em adição, ditos extrato e frações revelaram atividade antifúngica sobre C. albicans e eficácia no tratamento da candidose.

Figura a publicar: 41

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA

CPF: 19911412890

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Eng. Francisco José Longo 777

Cidade: São José dos Campos

Estado: SP

CEP: 12245-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 5

Nome: DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

CPF: 07452022840

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: rua prof Francisco Degni, 55

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14800-060

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 5

Nome: JÉSSICA DIANE DOS SANTOS

CPF: 39770802883

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Eng. Francisco José Longo, 777

Cidade: São José dos Campos

Estado: SP

CEP: 12245-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 5

Nome: LUCIANA RUANO DE OLIVEIRA FUGISAKI

CPF: 31278198890

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Av. Eng. Francisco José Longo, 777

Cidade: São José dos Campos

Estado: SP

CEP: 12245-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 5

Nome: REBECA PREVIATE MEDINA

CPF: 04555135970

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Professor Francisco Degni, 55

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14800-060

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU 8 29409161903371537.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante GRU 8 371537.pdf
Procuração	Proc e Posse 07-2018.pdf
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

					001-9					00190.00009 02940.916196 03371.537170 1 78760000007000				
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço														
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124														
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215, SAO PAULO -SP CEP:01049010														
Sacador/Avalista														
Nosso-Número			Nr. Documento			Data de Vencimento			Valor do Documento			(=) Valor Pago		
29409161903371537			29409161903371537			01/05/2019			70,00					
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço														
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37														
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910														
Agência/Código do Beneficiário										Autenticação Mecânica				
2234-9 / 333028-1														

					001-9					00190.00009 02940.916196 03371.537170 1 78760000007000				
Local de Pagamento										Data de Vencimento				
PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO										01/05/2019				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ										Agência/Código do Beneficiário				
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37										2234-9 / 333028-1				
Data do Documento		Nr. Documento		Espécie DOC		Aceite		Data do Processamento		Nosso-Número				
02/04/2019		29409161903371537		DS		N		02/04/2019		29409161903371537				
Uso do Banco		Carteira		Espécie		Quantidade		xValor		(=) Valor do Documento				
29409161903371537		17		R\$						70,00				
Informações de Responsabilidade do Beneficiário										(-) Desconto/Abatimento				
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal.														
O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.										(+) Juros/Multa				
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n														
o campo Número de Referência na emissão do pagamento.														
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de										(=) Valor Cobrado				
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT														
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço														
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO CPF/CNPJ: 48031918000124														
RUA QUIRINO DE ANDRADE 215,														
SAO PAULO-SP CEP:01049010														
Sacador/Avalista														
Código de Baixa										Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação				



FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6**DETALHE DO COMPROMISSO**

Convênio:	0033-0239-004900019792	Conta de Débito:	0239-000430023105
Tipo de Pagamento:	BLQ Outros		
Código de Barras:	00190000090294091619603371537170178760000007000		
No. compromisso banco:	1030412000100011	No. compromisso cliente:	371537/DS1 101009853
Nome/Razão Social do Beneficiário Original:	INPI - INST. NACIONAL DE PROPR		
Nome/Razão Social do Pagador Efetivo:	FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT		
CPF/CNPJ do Pagador Efetivo:	57.394.652/0001-75		
Valor Nominal:	70,00		
Desc./Abat.:	0,00	Juros:	0,00
Data de Vencimento:	25/04/2019		
Data de Pagamento:	15/04/2019		
Situação:	Efetivado		
No. Lista de Débito:		No. Protocolo:	PGTFORNB15042019900137942
Autenticação:	11CBC4E5865B76DF9E77E96		

Valor a Pagar: 70,00[retornar](#)**Central de Atendimento Santander Empresarial**

Das 8h às 20h, de segunda a sexta-feira, exceto feriados.

4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)
0800 723 5007 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

SAC - Atendimento 24h por dia, todos os dias.

0800 762 7777

0800 771 0401 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

Ouvidoria - Das 9h às 18h, de segunda a sexta-feira, exceto feriado.

0800 726 0322

0800 771 0301 (Pessoas com deficiência auditiva ou de fala)

[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de

Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado

todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

São Paulo, 16 de julho de 2018.



UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

9.º TABELÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 - 9º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3258-2011 - Fax: (11) 2174-6858
www.nopcartorio.com.br

Reconheço a 1 firma com valor econômico por semelhança de SERGIO ROBERTO NOBRE, do que dou fé.

Em tesº da verdade.

São Paulo/Capital, 24 de julho de 2018. Valor recebido R\$ 9,25
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba

ANDREI BARRETO DA SILVA



Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Quis dezasseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezasseite, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado. São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

[Handwritten signatures and initials]

9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 - 1.º ao 6.º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3259-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.noscartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO. do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO -
São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10
"Válido somente contra a falsificação. Selos pagos por verba"



S. Paulo, 06 MAR 2017



Artigo 1º - É declarada de utilidade pública a Associação Maestro Custódio Possidônio Martins, com sede em Apiaí.

Artigo 2º - Esta lei entra em vigor na data de sua publicação.

Palácio dos Bandeirantes, 28 de novembro de 2016.

GERALDO ALCKMIN

Marcos Fernando Elias Rosa

Secretário de Justiça e da Defesa da Cidadania

Samuel Moreira da Silva Junior

Secretário-Chefe da Casa Civil

Publicada na Assessoria Técnica da Casa Civil, aos 28 de novembro de 2016.

Ato do Governador

DECRETO(S)

DECRETOS DE 28-11-2016

Dispensando, a pedido e a partir de 25-11-2016, João Batista Moraes de Andrade, RG 3.704.467-9, da Função de Diretor Presidente da Fundação Memorial da América Latina.

Designando, Irineu Ferraes Carvalho, RG 6.951.115-9, Chefe de Gabinete, da Fundação Memorial da América Latina, para responder pelo expediente da Presidência da Fundação.

Nomeando, com fundamento no § 1º do art. 7º da Lei 952-76, e nos termos do art. 30 do Estatuto da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp, aprovado pelo Dec. 29.720-89, a alterações:

Sandro Roberto Valentini para exercer a função de Reitor da aludida Universidade, com mandato de 4 anos, a partir de 16-1-2017;

Sérgio Roberto Nobre para exercer a função de Vice-Reitor da aludida Universidade, com mandato de 4 anos, a partir de 16-1-2017.

DESPACHOS DO GOVERNADOR

DESPACHOS DO GOVERNADOR, DE 28-11-2016

No processo SE-542-2016 (SG-118.809-16), sobre ressarcimento de débito: "Diante dos elementos de instrução constantes dos autos, em especial da representação do Secretário da Educação e da Cota 253-2016, da Assessoria Jurídica do Gabinete do Procurador Geral do Estado, autorizo que o ressarcimento do débito do Município de Itapilópolis para com o Estado, decorrente da não aprovação de contas dos adiantamentos feitos ao Convênio celebrado em 2-7-2011, exercícios 2012, 2013 e 2015, faça-se em 24 parcelas mensais e consecutivas, observadas as normas legais e regulamentares atinentes à espécie e às recomendações assinaladas no pronunciamento do órgão jurisdicional-consultivo".

No processo SE-1046-2016 (SG-118.810-16), sobre ressarcimento de débito: "Diante dos elementos de instrução constantes dos autos, em especial da representação do Secretário da Educação e da Cota 253-2016, da Assessoria Jurídica do Gabinete do Procurador Geral do Estado, autorizo que o ressarcimento do débito do Município de Garça para com o Estado, decorrente da não aprovação de contas referente ao exercício de 2015 do adiantamento do Convênio celebrado em 5-7-2011, faça-se em 24 parcelas mensais e consecutivas, observadas as normas legais e regulamentares atinentes à espécie e às recomendações assinaladas no pronunciamento do órgão jurisdicional-consultivo".

No processo GBMar-16.075-16 (SG-107.997-16), sobre contratação de guarda-viagem: "A vista dos elementos de instrução do processo, com fundamento no inc. I do art. 1º da LC 1.093-2009, regulamentada pelo Dec. 54.682-2009, bem como das manifestações das Secretarias de Planejamento e Gestão e da Fazenda, autorizo a necessidade temporária de excepcional interesse público, a Polícia Militar do Estado de São Paulo a adotar as providências necessárias para a realização de processo seletivo simplificado, visando à contratação de 600 Guarda-Viagem, por tempo determinado e pelo prazo máximo de 5 meses, correspondente ao período de novembro/2016 a março/2017, tendo por limite o valor dispendido no período relativo à contratação anterior (nov/2015 a mar/2016), de modo que não haja expansão das despesas a serem cobertas pelo erário, obedecidos os demais preceitos legais e regulamentares atinentes à espécie".

Casa Civil

GABINETE DO SECRETÁRIO

Despacho do Secretário, de 23-11-2016

No processo CC 34660-2016, em que é interessada Casa Civil, sobre pagamento por indenização à Empresa Armazen Turismo e Eventos-ME, devido a fornecimento de refeições não constantes em contrato inicialmente celebrado: "A vista dos elementos que instruem os autos, notadamente o contrato no Relatório Final apresentado pela Comissão de Apropriação Preliminar, às fls. 316/326, complementado às fls. 334/335, no qual verifica-se que não houve má-fé por parte dos envolvidos, bem como inexistência de eventual ilegalidade, o Parecer da Consultoria Jurídica da Secretaria de Governo 478-2016, às fls. 338/343, que se manifestou pela Viabilidade do Pagamento, uma vez preenchidos todos os requisitos indicados nos incs. I a IV do art. 1º do Dec. 40.177-95, bem como o despacho da Chefia de Gabinete, às fls. 344/346, no qual com fulcro no art. 285, parágrafo 3, da Lei 10.261-6, com redação dada pela LC 942-2003, propõe o arquivamento da Apropriação Preliminar, tendo em vista que não ficou caracterizado ilícito administrativo, e, com fundamento no princípio geral do direito que prescreve o enriquecimento sem causa, autorizo o pagamento à empresa Armazen Turismo e Eventos - Ltda - ME, a título indenizatório, da importância de R\$ 13.500,00, decorrente da prestação de serviços de fornecimento de 300 refeições, sem cobertura contratual, no dia 19 de março do corrente ano, em Hotel Fazenda típica Abaíra/SP, aos participantes do III Conferência Estadual LGBT. Concomitante a Congregação Geral da Administração, conforme disposto no art. 1º, V, alínea a), do Dec. 53.334-2008."

Governo

FUNDO SOCIAL DE SOLIDARIEDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO

CHEFIA DE GABINETE

Extrato de 2º Termo de Aditamento ao Convênio Convênio FUSSESP 216-2014 - Processo FUSSESP 32236-2014.

Parecer CI: 198/2016

Participes: Fundo Social de Solidariedade do Estado de São Paulo e o Município de Burtama, por meio de seu Fundo Social de Solidariedade.

Cláusula Primeira: O 1º termo de aditamento ao convênio supracitado, celebrado em 23-12-2014 e o Plano de Trabalho que integra, juntos, respectivamente, às fls. 85 a 88 e 73 a 75 dos autos do Processo FUSSESP 32236-2014, ficam ratificados para constar que serão capacitados 6 e não 8 turnos por meio da

avença ora aditada, ficando restabelecido, assim, o número de turnos previsto no instrumento originário do ajuste.

Parágrafo Primeiro - A vista do conteúdo no "caput" desta cláusula fica ratificada a cláusula primeira do aludido 1º termo de aditamento para constar que será transferido ao CONVENIENTE, no total, a quantia de R\$ 7.320,00.

Parágrafo Segundo - Os recursos financeiros remanescentes, sob a responsabilidade do FUSSESP, serão transferidos ao CONVENIENTE de acordo com o Plano de Trabalho que integra o presente termo de aditamento, plano esse juntado às fls. 220 a 228 dos autos do Processo FUSSESP 32236-2014.

Cláusula Segunda: A cláusula segunda do mencionado 1º termo de aditamento fica também ratificada para constar que o valor correto do convênio é de R\$ 56.992,63, dos quais R\$ 28.282,63 a cargo do FUSSESP e R\$ 28.710,00 a cargo do CONVENIENTE.

Cláusula Terceira: A carga horária inerente ao Curso de Assistente de Cabeleria, ministrado no âmbito do Projeto "Escola de Beleza" fica reduzida a partir da 3ª turma, em conformidade com o plano de trabalho a que se refere o § 2º da cláusula primeira deste termo.

Cláusula Quarta: A cláusula sexta do convênio original, aludida pelo 1º termo de aditamento, sofre nova modificação e passa a vigorar com a seguinte redação:

"Cláusula Sexta: O prazo de vigência do presente convênio é de 42 meses, contados da data de assinatura do presente instrumento."

Data de assinatura: 28-11-2016.

CASA MILITAR

Resolução CMIL 17-610 - Cedece, de 28-11-2016

Edita o Plano Preventivo de Defesa Civil para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos como ressacas do mar e marés altas.

Considerando as atribuições legais consubstanciadas nos Decretos Estaduais nº 40.151, de 16-06-95 e nº 48.526, de 04-03-04, deste Secretário Chefe da Casa Militar e Coordenador Estadual de Defesa Civil;

Considerando que a Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC) desenvolve, de acordo com as peculiaridades de cada região, planos preventivos e de contingência visando à minimização de desastres;

Considerando o aumento do número, da frequência e da magnitude de eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos, como as ressacas do mar e as marés altas anômalas na costa do Estado de São Paulo, em especial desde o final da década de 1990;

Considerando que 52% das praias do Estado de São Paulo se encontram em risco alto e muito alto de erosão costeira;

Considerando os efeitos desses perigos costeiros, traduzidos em elevados prejuízos socioeconômicos e diversos tipos de transtornos à população, ao patrimônio público e privado, aos serviços e ao meio ambiente;

Considerando a necessidade da articulação do Sistema Estadual de Defesa Civil, para que, em conjunto com os municípios localizados nessas áreas, possam enfrentar as situações adversas em razão desses eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos, resolve:

Artigo 1º - Editar o Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), que passa a vigorar nos termos desta resolução e seus anexos.

Artigo 2º - O PPDC, a que se refere o "caput" deste artigo, abrangendo os quatro setores costeiros do Estado de São Paulo, englobando as Coordenadorias Estaduais de Defesa Civil de Registro (REDEC-1), Baixada Santista (REDEC-2) e São José dos Campos e Litoral Norte (REDEC-3).

Artigo 3º - O Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas) tem a seguinte composição:

I - Órgão Central: a Casa Militar, representada pela Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC);

II - Órgãos Regionais: as Coordenadorias Regionais de Defesa Civil de Registro (REDEC-1), Baixada Santista (REDEC-2) e São José dos Campos e Litoral Norte (REDEC-3);

III - Órgãos Setoriais: a Marinha do Brasil; o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET); o Instituto Oceanográfico (IO) da Universidade de São Paulo; o Instituto Geográfico (IG), Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC), o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), o Departamento de Ciências do Mar da Universidade Federal de São Paulo, o Centro de Estudo e Pesquisas sobre Desastres (CEPED/USP), o Corpo de Bombeiros e a Polícia Ambiental do Estado de São Paulo.

IV - Órgãos Municipais: as Prefeituras Municipais Envolvidas no Plano de Contingência, representadas pelas respectivas Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC).

V - Entidades privadas com reconhecida atuação na área.

Artigo 3º - Caberá às Coordenadorias Municipais de Defesa Civil envolvidas neste Plano, apoiadas pelas respectivas Coordenadorias Regionais de Defesa Civil, a edição de planos preventivos e de contingência específicos para cada município, em consonância com os pressupostos presentes nos anexos desta resolução.

Artigo 4º - O período de vigência desse plano será ininterrupto, devendo suas ações serem desenvolvidas conforme avisos e boletins emitidos pelos órgãos setoriais.

ANEXO I

Normas e procedimentos do Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas)

TÍTULO I

Disposições Preliminares

Artigo 1º - O Plano Preventivo de Defesa Civil (PPDC) para erosão costeira, inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), tem como objetivo principal aperfeiçoar as ações das Coordenadorias Regionais e Municipais de Defesa Civil na minimização dos efeitos desses eventos no âmbito dos quatro setores costeiros do Estado de São Paulo.

Artigo 2º - O Plano se baseia na adoção de medidas para conhecimento antecipado das ocorrências de eventos extremos especificados no artigo anterior, nas ações dos órgãos de defesa civil e nas edições de Planos de Contingência para os municípios sujeitos a esses eventos.

Artigo 3º - Para efeito desta resolução, seguem as seguintes considerações e conceitos:

I - Eventos Meteorológicos-Oceanoográficos Extremos: Marés Meteorológicos Positivos e Ressacas do Mar.

Eventos associados à influência de fatores meteorológicos (ondas extratropicais, frentes frias), oceanográficos (sobreelevação do nível do mar e ondas energéticas), astronômicos (marés de sizígia e de equinócio) e sazonais (efeito estereótipo devido ao aquecimento do oceano durante o verão). Quanto maior o número de fatores ocorrendo em conjugação, maiores serão os impactos, os efeitos danosos e os prejuízos na zona costeira. Os principais perigos gerados por esses eventos na costa são: erosão costeira, inundações costeiras, enchentes e alagamentos.

II - Marés Altas Anômalas

Trata-se de um termo popular para se referir à sobreelevação do nível médio do mar devido à ocorrência de uma maré meteorológica positiva, em especial se conjugada a uma maré de sizígia. Pode ocorrer sem a atuação de forte agitação marítima, portanto sem associação com uma ressaca.

III - Erosão costeira

O resultado do conjunto de processos sedimentares que atuam na praia pode ser medido por meio do seu balanço sedimentar que é, em outras palavras, a relação entre as perdas/saídas e os ganhos/entradas de sedimentos nessa praia. Quando o balanço sedimentar da praia for negativo, ou seja, quando a saída/perda de sedimentos for maior do que a entrada/ganho de sedimentos, haverá déficit sedimentar prejudicando assim o processo erosivo.

IV - Inundação

Submersão temporária de terrenos marginais à linha de costa oceânica e estuarina/lagunar, causada pela ocorrência de marés altas anômalas e ressacas.

V - Enchentes associadas a marés altas anômalas e ressacas

Submersão temporária de áreas marginais a cursos de água doce ou salobra na planície costeira, associada ao transbordamento canal fluvial/pluvial devido à ocorrência de precipitação intensa e à incapacidade de escoamento das águas para o estuário/laguna, ou ao canal de maré ou a praia, pelo efeito do empilhamento de água na costa/maré alta anômala.

VI - Alagamentos associados a marés altas anômalas e ressacas

Acúmulo de água em ruas, calçadas ou outras infraestruturas urbanas devido à extrapolação da capacidade de escoamento de sistemas de drenagem urbana, em decorrência de precipitação intensa, maré alta anômala e ressaca (por galgamento sobre estruturas urbanas em áreas com erosão costeira acelerada).

VII - Vento Previsto do Quadrante Sul

Durante os eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos, separar o quadrante sul, apresentando direções SW, SSW, S e SSE.

VIII - Altura e Direção de Ondas Significativas

A altura de uma onda marinha é definida como a diferença de nível entre a sua crista e o seu cavado. Como as alturas das ondas podem variar bastante, para se medir o estado do mar é utilizada a altura significativa das ondas, que corresponde à média do terço superior das ondas com maior altura registradas durante um período de tempo.

TÍTULO II

Do Funcionamento

CAPÍTULO I

Das Diretrizes Técnicas

Artigo 4º - O Plano Preventivo tem como base fundamental para a defesa civil:

1. Prevenção de condições meteorológicas associadas à elevação do nível do mar junto à costa;

2. Elevação do nível do mar prevista (altura das ondas, elevação do mar e maré astronômica);

3. Mapa de risco à erosão costeira.

Parágrafo único: Para inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), o Plano tem como base:

1. Prevenção de condições meteorológicas associadas à elevação do nível do mar junto à costa;

2. Elevação do nível do mar prevista (altura das ondas, elevação do mar e maré astronômica);

3. Mapa de risco a inundações costeiras e enchentes/alagamentos causados por marés altas e ressacas.

CAPÍTULO II

Da Estrutura

Artigo 5º - O Plano Preventivo para os perigos costeiros tratados nesta resolução está estruturado em 3 (três) níveis, incluindo, progressivamente, a possibilidade de ocorrências de ressacas e marés altas, a saber:

I - Observação: Vento previsto do quadrante sul (SSW a SSE) até 40 km/h, ondas de quadrante sul (SSW a SSE) com altura significativa inferior a 2,0 metros e elevação de maré (astronômica mais meteorológica) prevista até 1,8 metros;

II - Atenção: Vento previsto do quadrante sul (SSW a SSE) entre 40 e 80 km/h, ondas de quadrante sul (SSW a SSE) com altura significativa de 2,0 a 3,0 metros ou elevação de maré (astronômica mais meteorológica) prevista entre 1,8 a 2,0 metros;

III - Alerta: Vento previsto do quadrante sul (SSW a SSE) acima de 80 km/h, ondas de quadrante sul (SSW a SSE) com altura significativa acima de 3,0 metros ou elevação de maré (astronômica mais meteorológica) prevista acima de 2,0 metros.

§ 1º - Para cada nível estão previstos procedimentos operacionais, que visam à minimização das consequências desses eventos.

CAPÍTULO III

Do Procedimentos Operacionais

Artigo 6º - Os procedimentos operacionais de contingência previstos para os diferentes níveis, segundo o artigo 5º, são os seguintes:

1 - Nível de Observação

1) Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC):

- a) monitorar os critérios de vento e ondas do quadrante sul e elevação da maré;

b) acompanhar, através das REDECs, as Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) na operação dos Planos de Contingência;

c) convocar, quando necessário, os órgãos envolvidos para avaliação da operação do Plano;

d) emitir informações meteorológico-oceanoográficas às REDECs e COMDECs.

2) Coordenadoria Regional de Defesa Civil (REDEC):

- a) atender à convocação da CEDEC, para reunião dos órgãos envolvidos;

b) acompanhar as Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) na operação dos Planos de Contingência;

c) acompanhar as previsões, avisos e alertas emitidos pela CEDEC.

3) Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDECs):

- a) acompanhar as previsões, avisos e alertas emitidos pela CEDEC;

b) elaborar e desenvolver o Plano de Contingência Municipal para os perigos costeiros associados a eventos meteorológico-oceanoográficos extremos.

II - Nível de Atenção

1) Coordenadoria Estadual de Defesa Civil (CEDEC)

- a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de observação;

b) convocar reunião dos órgãos envolvidos, quando da mudança do nível, se for o caso;

c) registrar as informações acerca das vitórias de campo efetuadas pelas Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDECs);

d) comunicar o evento ao REDEC, COMDEC e órgãos de apoio, por meio de SMS e boletim meteorológico;

e) comunicar ao REDEC e COMDEC, por meio de SMS a mudança de nível do Plano.

2) Coordenadoria Regional de Defesa Civil (REDEC)

a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção;

3) Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC)

- a) proceder a totalidade dos itens definidos para o nível de atenção e adotar as medidas previstas nos respectivos planos de contingência municipal.

TÍTULO IV

Disposições Gerais

Artigo 7º - O Plano Preventivo encontra-se em condições de operacionalidade e sua implementação permite às Coordenadorias Municipais de Defesa Civil (COMDEC) a adoção de ações preventivas que visam minimizar ou até eliminar as consequências advindas da ocorrência de eventos.

ANEXO II

Procedimentos para a elaboração do Plano de Contingência Municipal para erosão costeira, inundações costeiras e alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas).

Para a edição dos Planos de Contingência de erosão costeira, inundações costeiras e alagamentos causados por eventos meteorológicos-oceanoográficos extremos (ressacas do mar e marés altas), deverão ser consideradas as seguintes ações de forma a contemplar os aspectos locais/municipais e suas peculiaridades:

1. Mapear e monitorar as áreas sujeitas aos perigos costeiros citados nesta resolução;

2. Divulgar os alertas e boletins da CEDEC para a população municipal;

3. Deslocar agentes públicos para pontos estratégicos ou de interesse, suscetíveis aos eventos dessa resolução;

4. Mobilizar as equipes de serviços públicos para limpeza, reparos e desobstruções;

5. Determinar a evacuação de moradores dos locais;

6. Definir abrigos provisórios para a população afetada;

7. Determinar o isolamento de ruas e avenidas sujeitas a inundações costeiras e enchentes/alagamentos;

8. Atualizar os dados e informações dos órgãos que compõem o sistema de contingência municipal;

9. Solicitar o apoio suplementar da CEDEC.

10. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

11. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

12. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

13. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

14. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

15. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

16. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

17. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

18. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

19. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

20. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

21. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

22. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

23. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

24. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

25. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

26. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

27. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

28. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

29. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

30. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

31. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

32. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

33. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

34. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

35. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

36. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

37. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

38. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

39. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

40. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

41. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

42. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

43. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

44. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

45. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

46. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

47. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

48. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

49. Manter atualizado o plano de contingência municipal.

do Rote: Rua Rui Barbosa: 1.213,18 m² de recampamento, no trecho entre as Ruas Luiz Gonzaga e Rio de Janeiro; Rua Luiz Gonzaga: 868,50 m² de recampamento, no trecho entre as Ruas Rui Barbosa e Bernardino Pinto.

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.
CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

II - COMPETE AO MUNICÍPIO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

PARÁGRAFO PRIMEIRO: A prestação de contas a que se refere a alínea "e" do inciso II desta cláusula será encaminhada pelo MUNICÍPIO ao ESTADO, no prazo máximo de 30 (trinta) dias contados do encerramento da obra detalhada no cronograma físico-financeiro às fls. 31 e 106, e será encaminhada aos autos do processo correspondente para exame por parte do órgão competente.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado;
PARÁGRAFO TERCEIRO: Inalterado;
CLÁUSULA TERCEIRA: A Cláusula Quarta, que trata do Valor, passa a ter a seguinte redação: O valor do presente Convênio é de R\$ 179.408,35, dos quais R\$ 160.000,00, de responsabilidade do ESTADO e o restante de responsabilidade do MUNICÍPIO.

Ficam mantidas todas as disposições do Convênio firmado em 16-05-2014 e aditado em 29-08-2016, naquilo em que não colidirem com as ora estabelecidas.

ASSINATURA: 21-12-2016

Extrato de Termo de Aditamento

1º Termo de Aditamento

Processo: 158022/2016 (0780/2014)

CONVÊNIO: 496/2014

PARCEIR JURIDICO: 708/2016

Objeto: Construção de Barracão Múltiplo Uso

PARTÍCIPES: CASA CIVILISUBSECRETARIA DE RELACIONAMENTO COM MUNICÍPIOS E O MUNICÍPIO DE PIRAJUÍ

CLÁUSULA PRIMEIRA: A Cláusula Primeira, que trata do Objeto, passa a ter a seguinte redação: O presente Convênio tem como objeto a transferência de recursos financeiros para a execução de execução de construção de um Barracão Múltiplo Uso com área de 145,80m², localizado na Avenida da Saudade s/nº, Centro, conforme projeto às fls. 132/9.

1. Limpeza manual do terreno: 470,00m². 2. Brica de concreto p fundação: 182,60m. 3. Laje pré-fabricada: 172,00m². 4. Alvenaria em bloco cerâmico: 398,49m³. 5. Porta lisa com batente de madeira: 12 pc. 6. Vidro liso: 27,18m². 7. Chapeiro: 972,98m². 8. Revestimento em placa cerâmica: 106,31m². 9. Piso cerâmico esmaltado: 201,79m². 10. Piso regularização e compactação: 309,10m². 11. Estrutura metálica p cobertura: 190,00kg. 12. Telha de barro: 172,00m². 13. Calhas e rufos: 92,40m. 14. Bacia sifonada c/ acoplada: 05 pc. 15. Lavatório de louça 01 pc. 16. Luminária: 28 pc. 17. Entrada de gás GLP c/ dois botijões de 13kg: 01 un. 18. Extintor manual p/ químico de 04kg: 02 pc. 19. Pintura tinta látex amarelo: 400,44m². 20. Instalações hidráulicas tubo PVC: 88,00m; 21. Serviços complementares diversos: 44,30m².

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.

CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

II - COMPETE AO MUNICÍPIO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

PARÁGRAFO PRIMEIRO: A prestação de contas a que se refere a alínea "e" do inciso II desta cláusula será encaminhada pelo MUNICÍPIO ao ESTADO, no prazo máximo de 30 (trinta) dias contados do encerramento da obra detalhada no cronograma físico-financeiro às fls. 29 e 172, e será encaminhada aos autos do processo correspondente para exame por parte do órgão competente.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado;

PARÁGRAFO TERCEIRO: Inalterado;

CLÁUSULA TERCEIRA: A Cláusula Sétima, que trata do Prazo, passa a ter a seguinte redação: O prazo para a execução do presente Convênio será de até 1120 (um mil e cento e vinte) dias, contados a partir da data de sua assinatura.

PARÁGRAFO PRIMEIRO: Inalterado.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado.
Ficam mantidas todas as disposições do Convênio firmado em 23-05-2014 e aditado em 07-11-2016, naquilo em que não colidirem com as ora estabelecidas.

ASSINATURA: 21-12-2016

Extrato de Termo de Aditamento

Processo: 774102/16

CONVÊNIO: 204/2016

PARCEIR JURIDICO: 740/2016

Objeto: Pavimentação, guias e sarjetas nas Ruas Benjamin

Constant e Mato Grosso

PARTÍCIPES: CASA CIVILISUBSECRETARIA DE RELACIONAMENTO COM MUNICÍPIOS E O MUNICÍPIO DE TAMBÁU

CLÁUSULA PRIMEIRA: A Cláusula Primeira, que trata do Objeto, passa a ter a seguinte redação: O presente Convênio tem como objeto a transferência de recursos financeiros para a execução de Execução de de 2.888,50m² de pavimentação asfáltica em CBQU, 1.134,00 m² de recampamento asfáltico (CBQU, esp = 4 cm) e 638,35m de guias e sarjetas, em vias do Município, conforme projeto às fls. 114/3 e 117/126.

Vias a serem beneficiadas: Rua Benjamin Constant: 2.322,99m² de pavimentação asfáltica em CBQU com base reforçada em pedra rachão e 335,35m de guias e sarjetas entre as Ruas Baldino Basilio e Mato Grosso; Rua Benjamin Constant: 1.134,00 m² de recampamento asfáltico em CBQU com esp. 4 cm, entre as Ruas Mato Grosso e Anísia Maria Modesto; Rua Mato Grosso: 565,80m² de pavimentação asfáltica em CBQU com base reforçada em pedra rachão e 103,00m de guias e sarjetas entre a Rua Benjamin Constant e Avenida José Gatto.

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.

CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

II - COMPETE AO MUNICÍPIO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

PARÁGRAFO PRIMEIRO: A prestação de contas a que se refere a alínea "e" do inciso II desta cláusula será encaminhada pelo MUNICÍPIO ao ESTADO, no prazo máximo de 30 (trinta) dias contados do encerramento da obra detalhada no cronograma físico-financeiro às fls. 43 e 126, e será encaminhada aos autos do processo correspondente para exame por parte do órgão competente.

PARÁGRAFO SEGUNDO: Inalterado;

PARÁGRAFO TERCEIRO: Inalterado;

CLÁUSULA TERCEIRA: A Cláusula Quarta, que trata do Valor, passa a ter a seguinte redação: O valor do presente Convênio é de R\$ 200.000,01, dos quais R\$ 200.000,00, de responsabilidade do ESTADO e o restante de responsabilidade do MUNICÍPIO.

Ficam mantidas todas as disposições do Convênio firmado em 30-06-2016 e aditado em 07-12-2016, naquilo em que não colidirem com as ora estabelecidas.

ASSINATURA: 21-12-2016

Governo

GABINETE DO SECRETÁRIO

Resolução de 21-12-2016

Designando José Váler da Silva Júnior, RG 23.854.858-2, para responder pela Coordenação de Serviços ao Cidadão - CSC, substituído por Sérgio Roberto Nogueira, Vice-Reitor da aludida Universidade, para declarar que seus mandatos são de 4 anos, a partir de 15-1-2017.

Apostila do Secretário, de 21-12-2016

No decreto publicado em 29-11-2016, em que é interessado Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp, relatado a nomeação de Sandro Roberto Vianini, Reitor da aludida Universidade e Sérgio Roberto Nogueira, Vice-Reitor da aludida Universidade, para declarar que seus mandatos são de 4 anos, a partir de 15-1-2017.

Despachos do Secretário, de 21-12-2016

No processo SEDPAD-81.174-15 vols. I e II, em que é interessado Associação Brasil Equilíbrio - ABE, "A vista dos elementos que instruem os presentes autos, com especial destaque para a representação formulada pela Secretária dos Direitos da Pessoa com Deficiência, e tendo presente, ainda, o Parecer 459-2016 da Consultoria Jurídica da Secretaria de Governo, qualifica, com fundamento na LC 846-98, o instituto Ono, inscrito no CNPJ sob o nº 22.780.532/0001-62, como organização social na área de atendimento ou promoção dos direitos das pessoas com deficiência, de modo a habilitá-la à celebração de contrato de gestão com o Estado, por intermédio da cidade Pasto, observadas, na oportunidade, as normas legais e regulamentares pertinentes."

No processo SC.129.064-2015, vols. I ao II, em que é interessado Instituto Odeon: "A vista dos elementos que instruem os presentes autos, com especial destaque para a representação formulada pela Secretária da Cultura, e tendo presente, ainda, o Parecer 438-2016, da Consultoria Jurídica da Secretaria de Governo, qualifica, com fundamento na LC 846-98, a Fundação Patrimônio Histórico da Energia e Saneamento, inscrita no CNPJ sob o nº 02.414.436/0001-52, como organização social da área da cultura, de modo a habilitá-la à celebração de contrato de gestão com o Estado, por intermédio da aludida Pasto, observadas, na oportunidade, as normas legais e regulamentares incidentes na espécie."

No processo SC.171.441-2015, vols. I e II, em que é interessado Fundação Energia e Saneamento: "A vista dos elementos que instruem os presentes autos, com especial destaque para a representação formulada pelo Secretário Adjunto da Cultura, respondendo pelo Expediente da Secretaria da Cultura, e tendo presente, ainda, o Parecer 438-2016, da Consultoria Jurídica da Secretaria de Governo, qualifica, com fundamento na LC 846-98, a Fundação Patrimônio Histórico da Energia e Saneamento, inscrita no CNPJ sob o nº 02.414.436/0001-52, como organização social da área da cultura, de modo a habilitá-la à celebração de contrato de gestão com o Estado, por intermédio da aludida Pasto, observadas, na oportunidade, as normas legais e regulamentares incidentes na espécie."

AGÊNCIA REGULADORA DE SERVIÇOS PÚBLICOS DELEGADOS DE TRANSPORTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO DIRETOR

Deliberações do Conselho Diretor, de 15-12-2016

PROTOCOLO ADP 213.167/12

Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Protocolo ADP 213.167/12, o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

HOMOLOGA a postergação da data de término do item 0501020102 (SP-065 Recuperação - km 159-290 ao 168-388) - 1ª Intervenção) do cronograma físico-financeiro do Contrato de Concessão 003/ARTESP/09 do Lote 07, outorgado a Concessionária Rota das Bandeiras S.A. de 31-08-2012 para 14-08-2013.

RECONHECE que referida alteração do cronograma físico-financeiro produziu desequilíbrio em Valor Presente Líquido (VPL) base PD - julho/2008, de R\$ 263 mil a favor do Poder Concedente, conforme cálculos realizados pela Diretoria de Controle Econômico e Financeiro.

Tudo conforme a instrução dos autos, especialmente os pronunciamentos da Diretoria de Investimentos FD DIN 23568/15 (fls. 93/94); RT DIN 002/16 (fls. 95/97); FD DIN 23212/16 (fl. 98); da Diretoria de Operações FD DOP 48868/15 (fl. 91); FD DOP 48700/15 (fl. 92); da Diretoria de Controle Econômico e Financeiro FD DCE 04952/16 (fl. 99) e FD DCE 05020/16 (fl. 101); da Diretoria de Assuntos Institucionais FD DAI 08918/16 (fls. 102/105) e FD DAI 09989/16 (fl. 106) e da DO. Consultoria Jurídica vide Parecer CJ/ARTESP 480/2016 (fls. 108/113).

Fica ratificada toda instrução processual e determinada a adoção das medidas pertinentes pelas áreas técnicas da ARTESP.

PROTOCOLO ADP 213.158/12
Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Protocolo ADP 213.158/12, o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

HOMOLOGA a postergação da data de término do item 0501020102 (SP-065 Recuperação - km 18-450 ao 35-850) - 1ª Intervenção) do cronograma físico-financeiro do Contrato de Concessão 003/ARTESP/09 do Lote 07, outorgado a Concessionária Rota das Bandeiras S.A. de 31-08-2012 para 06-02-2013.

RECONHECE que referida alteração do cronograma físico-financeiro produziu desequilíbrio em Valor Presente Líquido (VPL) base PD - julho/2008, de R\$ 192 mil a favor do Poder Concedente, conforme cálculos realizados pela Diretoria de Controle Econômico e Financeiro.

Tudo conforme a instrução dos autos, especialmente os pronunciamentos da Diretoria de Investimentos FD DIN 02/47/13 (fl. 70); FD DIN 28994/16 (fls. 140/141); RT DIN 02/4/16 (fls. 142/144) e FD DIN 30016/16 (fl. 145); da Diretoria de Operações FD DOP 23027/16 (fl. 134); FD DOP 23168/16 (fl. 135) e FD DOP 23222/16 (fl. 136); da Diretoria de Controle Econômico e Financeiro FD DCE 04583/16 (fl. 146) e FD DCE 04649/16 (fl. 148); da Diretoria de Assuntos Institucionais FD DAI 08895/16 (fls. 149/152) e FD DAI 09991/16 (fls. 153/160).

Fica ratificada toda instrução processual e determinada a adoção das medidas pertinentes pelas áreas técnicas da ARTESP.

PROTOCOLO ADP 213.159/12
Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Protocolo ADP 213.159/12, o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

HOMOLOGA a postergação da data de término do item 0501020103 (SP-065 Recuperação - km 35-850 ao 58-240) - 1ª Intervenção) do cronograma físico-financeiro do Contrato de Concessão 003/ARTESP/09 do Lote 07, outorgado a Concessionária Rota das Bandeiras S.A. de 31-08-2012 para 06-03-2013.

RECONHECE que referida alteração do cronograma físico-financeiro produziu desequilíbrio em Valor Presente Líquido (VPL) base PD - julho/2008, de R\$ 258 mil a favor do Poder Concedente, conforme cálculos realizados pela Diretoria de Controle Econômico e Financeiro.

Tudo conforme a instrução dos autos, especialmente os pronunciamentos da Diretoria de Investimentos FD DIN 28514/16 (fls. 58/59); RT DIN 0048/15 REV 01 (fl. 60/62) e FD DIN 30014/16 (fl. 63); da Diretoria de Operações FD DOP 22983/16 (fl. 52); FD DOP 23356/16 (fl. 54); da Diretoria de Controle Econômico e Financeiro FD DCE 04582/16 (fl. 64) e FD DCE 04648/16 (fl. 66); da Diretoria de Assuntos Institucionais FD DAI 08877/16 (fl. 67/70) e FD DAI 09988/16 (fl. 71) e da DO. Consultoria Jurídica vide Parecer CJ/ARTESP 487/2016 (fls. 73/78).

Fica ratificada toda instrução processual e determinada a adoção das medidas pertinentes pelas áreas técnicas da ARTESP.

PROTOCOLO ADP 213.165/12
Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Protocolo ADP 213.165/12, o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

HOMOLOGA a postergação da data de término do item 0501040104 (SP-332 Recuperação - km 148-135 ao 159-290) - 1ª Intervenção) do cronograma físico-financeiro do Contrato de Concessão 003/ARTESP/09 do Lote 07, outorgado a Concessionária Rota das Bandeiras S.A. de 31-08-2012 para 14-08-2013.

RECONHECE que referida alteração do cronograma físico-financeiro produziu desequilíbrio em Valor Presente Líquido (VPL) base PD - julho/2008, de R\$ 317 mil a favor do Poder Concedente, conforme cálculos realizados pela Diretoria de Controle Econômico e Financeiro.

Tudo conforme a instrução dos autos, especialmente os pronunciamentos da Diretoria de Investimentos FD DIN 02781/13 (fl. 74); FD DIN 23969/15 (fl. 83/84); RT DIN 002/16 (fls. 85/87) e FD DIN 23212/16 (fl. 88); da Diretoria de Operações FD DOP 48692/15 (fl. 81); FD DOP 48698/15 (fl. 82); da Diretoria de Controle Econômico e Financeiro FD DCE 04951/16 (fl. 89) e FD DCE 05001/16 (fl. 91); da Diretoria de Assuntos Institucionais FD DAI 08923/16 (fls. 92/95) e FD DAI 09986/16 (fl. 96) e da DO. Consultoria Jurídica vide Parecer CJ/ARTESP 486/2016 (fls. 98/103).

Fica ratificada toda instrução processual e determinada a adoção das medidas pertinentes pelas áreas técnicas da ARTESP.

PROTOCOLO ADP 212.342/2016
Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Processo ARTESP 022.342/2016 (Protocolo 339.683/16), o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

ENCAMINHA ao Secretário de Governo, minuta de Decreto de Declaração de Utilidade Pública, para fins de desapropriação, a cargo da Viadonon Concessionária de Rodovia S/A, dos imóveis necessários às obras de melhoria do Rodovia Marechal Rondon, SP-309, Município e Comarca de Aracatuba, com área total de 1.087,01 m² (um mil e oitenta e sete metros quadrados e um decímetro quadrado).

Tudo conforme a instrução dos autos, especialmente os pronunciamentos das Diretorias de Investimentos, Assuntos Institucionais e D.D. Consultoria Jurídica, resultantes nos despachos FD DIN 39678/16 (fl. 90); FD DIN 41516/16 (fl. 91); FD DIN 42323/16 (fl. 93); FD DAI 10678/16 (fl. 110); FD DAI 10854/16 (fl. 111); FD DAI 10871/16 (fl. 113); Parecer Técnico Institucional 0043/16 (fl. 106/109) e Cópia do Parecer Referencial CJ/ARTESP 72/2016 (fls. 98/105).

Fica ratificada toda instrução processual e determinada a adoção das medidas pertinentes pelas áreas técnicas da ARTESP.

PROTOCOLO ADP 019.493/2015

Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Processo ARTESP 019.493/2015 (Protocolo 299.968/15), o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

a) **CONHECE** o recurso interposto pela Concessionária Auto Raposo Tavares S.A. - CART, em conformidade com a Lei Estadual 10.177/98, contra a decisão do Diretor de Operações, identificada como DL DOP 001/16, que indeferiu a defesa prévia e as alegações finais relativas à notificação NOT DOP 001/16; e

b) **NO MÉRITO, NEGA-LHE PROVIMENTO**, mantida a decisão administrativa condenatória proferida pelo Diretor de Operações.

Tudo conforme a instrução dos autos, especialmente os pronunciamentos das Diretorias de Operações, Assuntos Institucionais e D.D. Consultoria Jurídica, resultantes nos despachos FD DOP 52246/15 (fls. 24/27); FD DOP 52529/15 (fl. 28); FD DOP 54981/15 (fl. 39); FD DOP 54984/15 (fl. 40); FD 55154/15 (fl. 41); FD DAI 56969/15 (fl. 42); FD DAI 57034/15 (fl. 43); FD DOP 56988/15 (fl. 45); FD DOP 57007/15 (fl. 46); FD DOP 57188/15 (fl. 47); FD DAI 57458/15 (fl. 48/50); FD DAI 57458/15 (fl. 51); FD DAI 01415/16 (fl. 64); FD DAI 01511/16 (fl. 65); FD DOP 06097/16 (fl. 67); FD DOP 06208/16 (fl. 68); FD DOP 00101/16 (fl. 69/70); FD DOP 06551/16 (fl. 72); FD DOP 09061/16 (fl. 76); FD DOP 09185/16 (fl. 77); FD DOP 11426/16 (fl. 136); FD DOP 12480/16 (fl. 137); FD DOP 12938/16 (fl. 138); FD DAI 03831/16 (fls. 139/141); FD DAI 04035/16 (fl. 142); FD DAI 05423/16 (fl. 150); FD DAI 05626/16 (fl. 151); FD DOP 36797/16 (fl. 161); FD DOP 36899/16 (fl. 163); FD DOP 37276/16 (fl. 164); Parecer CJ/ARTESP 462/2016 (fls. 53/62); Parecer CJ/ARTESP 72/2016 (fls. 144/148).

Fica ratificada toda instrução processual e determinada a adoção das medidas pertinentes pelas áreas técnicas da ARTESP.

PROTOCOLO ADP 019.492/2015

Visto, relatado e discutido o assunto tratado nos autos do Processo ARTESP 019.492/2015 (Protocolo 299.968/15), o Conselho Diretor da ARTESP, no uso de suas atribuições legais, diante dos elementos de instrução do feito, que fundamentam a presente, DELIBERA nos seguintes termos:

a) **CONHECE** o recurso interposto pela Concessionária Auto Raposo Tavares S.A. - CART, em conformidade com a Lei Estadual 10.177/98, contra a decisão do Diretor de Operações, identificada como DL DOP 001/16, que indeferiu a defesa prévia e as alegações finais relativas à notificação NOT DOP 001/15; e

b) **NO MÉRITO, NEGA-LHE PROVIMENTO**, mantida a decisão administrativa condenatória proferida pelo Diretor de Operações

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DO SOBRENADANTE DE
S. mutans E USO DO EXTRATO E FRAÇÕES DO SOBRENADANTE DE
S. mutans COMO ANTIFÚNGICO**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção refere-se a um método de obtenção de extrato bruto e frações de sobrenadante da cultura de *S. mutans* com atividade inibitória sobre *C. albicans*.

[002] Dito método revelou ser eficaz na extração, fracionamento e identificação das substâncias produzidas por *S. mutans*. Em adição, ditos extrato e frações revelaram atividade antifúngica sobre *C. albicans* e eficácia no tratamento da candidose.

Fundamentos da invenção:

[003] *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. Atualmente, o aumento das infecções por *Candida* está associado principalmente ao uso de drogas imunossupressoras para tratamento de neoplasias, administração frequente de antibióticos de amplo espectro e doenças que comprometem o sistema imunológico (Wong et al., 2016). *Candida albicans* representa a espécie mais patogênica do gênero *Candida*, e este fato está diretamente correlacionado com a habilidade em alternar as distintas morfologias (levedura, pseudohifas e hifas) o que representa um dos fatores de virulência, como a formação de biofilme.

[004] *C. albicans* pode ser encontrada em diferentes morfologias, como células leveduriformes e filamentosas (Shapiro et al., 2011), sendo o crescimento filamentoso de

particular interesse para a formação de biofilmes e para a patogênese do fungo (Woolford et al., 2017). As formas filamentosas, tais como pseudohifas e hifas, medeiam a adesão dos fungos às células e tecidos epiteliais, promovendo a invasão e danos subsequentes ao hospedeiro (Sudbery et al., 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, existe um claro aumento na taxa de mortalidade causada por esse fungo. Devido à algumas semelhanças entre células humanas e fúngicas, existe menor quantidade de antifúngicos disponíveis do que medicamentos antibacterianos.

[005] Além disso, o tratamento da candidose bucal tem se tornado muito difícil devido ao surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais disponíveis. Portanto, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para a candidose bucal é extremamente necessário e constitui um grande desafio para a área médica-odontológica. Uma das possíveis alternativas terapêuticas que tem sido investigada é a busca por novos agentes antifúngicos a partir de substâncias naturais produzidas pelos próprios micro-organismos (Peleg et al., 2010; Barbosa et al., 2016).

[006] Sabe-se que as interações entre bactérias e fungos são comuns em humanos e podem influenciar a transição entre o estado de saúde e a doença, dentro de um ambiente específico no hospedeiro, como a cavidade bucal. A elucidação dos mecanismos de interação entre as diferentes espécies microbianas, inseridas na mesma comunidade, é extremamente importante para a compreensão das doenças infecciosas e para

o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos (Peleg et al., 2010).

[007] Desse modo, as interações entre os micro-organismos têm sido bastante estudadas, verificando-se que as bactérias podem levar a redução das células fúngicas devido à competição por nutrientes e pela secreção de moléculas antifúngicas. Estudos envolvendo a obtenção de novos compostos provenientes de extratos microbianos vêm sendo cada vez mais estudados, uma vez que as bactérias e fungos produzem uma gama de moléculas bioativas quimicamente relevantes no ambiente extracelular, sendo interessantes alvos de estudo devido a seus impactos diretos em outros micro-organismos, bem como no hospedeiro (Atiphasworn et al., 2017; Jeong et al., 2017; Shekh e Roy, 2012; Strom et al., 2002).

[008] Sendo assim, a presente invenção refere-se ao método de obtenção de extrato bruto e frações de sobrenadante da cultura de *S. mutans*, uma bactéria Gram-positiva presente na cavidade bucal. Dito método revelou ser eficaz na extração, fracionamento e identificação das substâncias produzidas por *S. mutans*. Ditos extrato e frações revelaram atividade antifúngica sobre *C. albicans* e eficácia no tratamento da candidose em animais.

Estado da técnica:

[009] Alguns documentos do estado da técnica descrevem um processo de obtenção de compostos a base de substâncias extraídas de bactérias Gram-positivas assim como seu uso contra *Candida albicans*.

[0010] O documento "*Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in the gut" de Garsin et al. (2013),

revela um modelo de infecção em nemátodos para estudar a co-infecção entre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, que resultou em diminuição da virulência e menor mortalidade dos animais comparado com a infecção pelas espécies isoladas. Assim, é sugerido que *E. faecalis* e *C. albicans* promovem uma associação mutuamente benéfica para o hospedeiro. Já a presente invenção é diferente, pois refere-se às substâncias produzidas por *S. mutans*, e o referido documento citado acima não avalia a espécie *S. mutans*.

[0011] O documento "*Mutanobactin A from the human oral pathogen Streptococcus mutans is a cross-kingdom regulator of the yeast-mycelium transition*" de Joyner et al. (2010) revela o isolamento e caracterização de uma substância obtida da cultura de *S. mutans* em caldo de infusão cérebro-coração (BHI), nomeada de mutanobactin A, e demonstra que esse metabólito é capaz de influenciar a transição micélio-levedura de *Candida albicans in vitro*. Para o isolamento dessa substância, a fermentação da cepa de *S. mutans* foi realizada em um biorreator, contendo 15 L de caldo BHI, sob condições microaerófilas a 37°C. Após 48 horas, as células de *S. mutans* e o caldo de seu crescimento foram extraídos com acetato de etila e o solvente foi removido sob vácuo. O extrato resultante foi ressuspenso em metanol e particionado com hexano para retirada de ácidos graxos. A fase metanólica foi misturada com um volume igual de água e sujeita a uma partição (3x) com diclorometano. O solvente da fase diclorometano foi removido sob vácuo, obtendo-se um extrato bruto castanho escuro. O mesmo foi submetido a uma cromatografia flash C-18 em escala preparativa, utilizando para eluição um gradiente de MeOH:H₂O (20% a 100%), gerando

uma única fração (240 mg) rica em mutanobactin. Posteriormente, essa fração foi submetida a um fracionamento utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), uma coluna preparativa de fase reversa C-18 e eluição em modo gradiente (fase móvel: 50% a 100% de metanol em água), seguido de fracionamento por CLAE semi-preparativa, usando coluna C-18 e eluição em modo isocrático (fase móvel: 88% metanol em água), resultando em 8 mg de mutanobactin A. Já a presente invenção difere do estudo citado acima, já que o tempo de incubação da cultura de *S. mutans* foi de apenas 4 horas e após esse período, foi feita uma filtração para a separação do caldo e das células de *S. mutans*, sendo que a extração com acetato de etila (3 vezes) foi feita apenas com o caldo fermentado. Em seguida, o solvente orgânico foi removido sob vácuo, e o extrato bruto obtido foi liofilizado. A partir do perfil cromatográfico do extrato bruto adquirido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), optou-se por submetê-lo a um fracionamento em coluna de sílica derivatizada C-18 (150 g, $\Phi = 3,5$ cm) utilizando como eluente diferentes soluções de MeOH:H₂O (36:64, 49:51, 60:40, 76:24, 100:0). Foram obtidas 5 diferentes frações (SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4 e SM-F5), sendo que a fração com melhor efeito contra *C. albicans* foi a F2 (49:51 de MeOH:H₂O).

[0012] Adicionalmente, o estudo citado acima também faz a extração inicial com acetato de etila, no entanto, o extrato obtido após a evaporação do solvente foi particionado com hexano e, posteriormente, com diclorometano, garantindo possivelmente a obtenção de uma fração rica em substâncias de média polaridade. Lembrando que o isolamento da substância

mutanobactin A foi feito a partir dessa fração, após diferentes fracionamentos utilizando colunas de fase reversa. Como descrito acima, na presente invenção, não foram feitas partições do extrato bruto utilizando solventes apolares ou de baixa polaridade, sendo que o mesmo é apenas fracionado utilizando coluna de fase reversa C-18, portanto, as frações obtidas são, possivelmente, ricas em substâncias de média a alta polaridade.

[0013] Já no documento intitulado "*Fungal biofilm inhibitors from a human oral microbiome-derived bacterium*" de Wang et al. (2012), foram isolados e caracterizados três novos análogos da substância mutanobactin A (mutanobactin B, C e D). Para isso, *S. mutans* UA159 foi preparado por inoculação de 100 mL de uma cultura em 40 L de caldo BHI. A cultura foi incubada durante 96 h, e após esse período foi extraída três vezes com volumes iguais de acetato de etila, que foi evaporado sob vácuo para obtenção do extrato bruto. O mesmo foi fracionado em uma coluna cromatográfica HP20SS (gradiente em etapas de 30, 50, 70, 90 e 100% de MeOH em H₂O) e foram obtidas cinco frações, sendo que as frações Fr.4 (824 mg) e Fr.5 (156 mg) foram combinadas e, posteriormente, foram separadas em sete subfrações por CLAE preparativa em modo reverso. A subfração Fr.7-5 foi submetida a um fracionamento por CLAE semi-preparativa de fase reversa (eluição em modo isocrático, 85% MeOH em H₂O, seguida por eluição com 70% de CH₃CN em H₂O, 4,0 mL min⁻¹) para obtenção de mutanobactin A, B, C e D. Os efeitos dessas substâncias no crescimento de *C. albicans* DAY185 foram testados usando os métodos prescritos nas diretrizes do CLSI, e também foram testadas em um ensaio projetado para determinar a inibição

da formação de biofilme de *C. albicans*. Para os testes, os metabólitos foram solubilizados em DMSO a uma concentração final de 20 mM. O composto D foi o inibidor mais potente da formação de biofilme.

[0014] Diferentemente desse estudo, na presente invenção, *S. mutans* UA159 foi preparado na proporção de 1 mL da cultura em 6 mL de caldo BHI e incubado durante 4 horas. Novamente, ressaltamos a filtração que foi feita após o período de incubação para a separação do caldo e das células de *S. mutans*, o que possibilitou a extração (3x) com acetato de etila. O solvente foi evaporado sob vácuo para a obtenção do extrato bruto, que também foi separado em cinco frações, mas em diferentes proporções de MeOH:H₂O (36:64, 49:51, 60:40, 76:24, 100:0) ao compararmos com o artigo citado. Além disso, as frações utilizadas no trabalho acima diferem da fração que obtivemos melhores resultados, já que no artigo acima foram utilizadas as frações 4 e 5 (90% e 100% de MeOH em H₂O), possivelmente ricas em substâncias de média polaridade, enquanto a fração com melhor efeito em nosso estudo foi a fração 2 (49% de MeOH em 51% H₂O), possivelmente rica em substâncias de média a alta polaridade.

[0015] Também é importante ressaltar que nos estudos anteriores o efeito das substâncias produzidas por *S. mutans* foram testadas apenas *in vitro* (Garsin et al. 2013, Joyner et al. 2010 e Wang et al. 2012) e em nematódeos *C. elegans*, modelo invertebrado usado como triagem para estudos em camundongos (Garsin et al. 2013). No entanto, na presente invenção as substâncias produzidas por *S. mutans* foram triadas no modelo invertebrado *Galleria mellonella*, e então testadas em modelo vertebrado de camundongos, no qual sua

eficácia foi comprovada para o tratamento da candidose bucal.

Breve descrição da invenção:

[0016] A presente invenção refere-se a um método de obtenção de extrato bruto e frações de sobrenadante da cultura de *S. mutans* com atividade inibitória sobre *C. albicans*.

[0017] Dito método revelou ser eficaz na extração, fracionamento e identificação das substâncias produzidas por *S. mutans*. Em adição, dito extrato e frações revelaram ser eficazes sobre a patogenicidade de *C. albicans*, tanto em estudos *in vitro* com ensaios de filamentação, inibição da formação de biofilmes e de expressão de genes da virulência como *in vivo* com ensaios no modelo de *Galleria mellonella* e camundongos imunossuprimidos.

Breve descrição das figuras:

[0018] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue:

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

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

Figuras 3 e 4. Compostos obtidos após rotaevaporação do acetato de etila coletados com metanol e remoção desse solvente com auxílio de uma bomba por aproximadamente 16 horas.

Figura 5. Extrato sendo liofilizado.

Figura 6. Extrato bruto obtido.

Figura 7. Fracionamento do extrato bruto utilizando coluna de sílica derivatizada C-18 com diferentes soluções

de MeOH:H₂O como eluente.

Figura 8. Erlenmeyers contendo as cinco frações obtidas.

Figura 9. Cromatogramas obtidos por CG-EM do SM-EB (Azul) e do controle (preto).

Figura 10. Cromatogramas obtidos por CG-EM da fração SM-F1 (vermelho) e do controle (preto).

Figura 11. Cromatogramas obtidos por CG-EM da fração SM-F2 (rosa) e do controle (preto).

Figura 12. Cromatograma obtido por CG-EM do controle.

Figura 13. Cromatograma obtido por CG-EM de SM-EB.

Figura 14. Cromatograma obtido CG-EM da fração SM-F1.

Figura 15. Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F2.

Figura 16. Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans*, em que **A)** Grupo controle formado por *C. albicans* + PBS com a presença de inúmeras hifas; **B)** *C. albicans* tratada com extrato bruto (5 mg/mL); **C)** *C. albicans* tratada com extrato bruto (10 mg/mL); **D)** *C. albicans* tratada com extrato bruto (15 mg/mL); nas imagens **B**, **C** e **D**, o extrato bruto reduziu a formação de hifas. Aumento original: 400x.

Figura 17. Quantificação de hifas no teste de filamentação de *C. albicans in vitro*, em que o gráfico representa a mediana dos escores obtidos pela determinação da quantidade de hifas de *C. albicans* nos seguintes grupos: *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + Extrato bruto (1 mg/mL), *C. albicans* + Extrato bruto (2 mg/mL), *C. albicans* + Extrato bruto (5 mg/mL), *C. albicans* + Extrato bruto (10

mg/mL) e *C. albicans* + Extrato bruto (15 mg/mL). Os escores foram atribuídos de acordo com o número de hifas presentes em cada campo microscópico: 0: ausência de hifas; 1: de 1 a 10 hifas; 2: de 11 a 20 hifas; 3: de 21 a 30 hifas; 4: 31 a 40 hifas; 5: mais de 40 hifas presentes. *Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos "*C. albicans* + PBS" e "*C. albicans* + Extrato Bruto 5 mg/mL" ($p=0,0129$), "*C. albicans* + Extrato Bruto 1 mg/mL" e "*C. albicans* + Extrato Bruto 5 mg/mL" ($p=0,0106$) e "*C. albicans* + Extrato Bruto 2 mg/mL" e "*C. albicans* + Extrato Bruto 5 mg/mL" ($p=0,0129$). (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

Figura 18. Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans* quando em contato com a fração SM-F1, em que **A)** Grupo controle formado por *C. albicans* + PBS; **B)** *C. albicans* tratada com SM-F1 (5 mg/mL); **C)** *C. albicans* tratada com SM-F1 (10 mg/mL); **D)** *C. albicans* tratada com SM-F1 (15 mg/mL); verificamos em todas as imagens a presença de inúmeras hifas. Aumento original: 400x.

Figura 19. Quantificação das hifas no ensaio da filamentação de *C. albicans in vitro*, em que o gráfico representa a mediana dos escores obtidos pela determinação da quantidade de hifas de *C. albicans* nos seguintes grupos: *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + SM-F1 (5 mg/mL), *C. albicans* + SM-F1 (10 mg/mL) e *C. albicans* + SM-F1 (15 mg/mL). Os escores foram atribuídos de acordo com o número de hifas presentes em cada campo microscópico: 0: ausência de hifas; 1: de 1 a 10 hifas; 2: de 11 a 20 hifas; 3: de 21 a 30 hifas; 4: 31 a 40 hifas; 5: mais de 40 hifas presentes. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

Figura 20. Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans* quando em contato com a fração SMF-2, em que **A)** Grupo controle formado por *C. albicans* + PBS: observa-se a prevalência de inúmeras hifas, formando uma extensa rede; **B)** *C. albicans* tratada com SM-F2 (5 mg/mL): observa-se ainda a presença de hifas; **C)** *C. albicans* tratada com SM-F2 (10 mg/mL); **D)** *C. albicans* tratada com SM-F2 (15 mg/mL); verifica-se nas imagens **C** e **D** que a SM-F2 reduziu a formação de hifas. Aumento original: 400x.

Figura 21. Quantificação das hifas no ensaio da filamentação de *C. albicans in vitro*, em que o gráfico representa a mediana dos escores obtidos pela determinação da quantidade de hifas de *C. albicans* nos seguintes grupos: *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + SM-F2 (5 mg/mL), *C. albicans* + SM-F2 (10 mg/mL) e *C. albicans* + SM-F2 (15 mg/mL). Os escores foram atribuídos de acordo com o número de hifas presentes em cada campo microscópico: 0: ausência de hifas; 1: de 1 a 10 hifas; 2: de 11 a 20 hifas; 3: de 21 a 30 hifas; 4: 31 a 40 hifas; 5: mais de 40 hifas presentes. ***Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos "*C. albicans* + PBS" e "*C. albicans* + SM-F2 10 mg/mL" ($p=0,0004$). (Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$).

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura da filamentação de *C. albicans*, em que **A-B)** Grupo controle de *C. albicans* + PBS: observa-se a presença de inúmeras leveduras e hifas. Aumento original: **(A)** 1000X e **(B)** 3000x; **C-D)** *C. albicans* e tratamento com extrato bruto (5 mg/mL): é possível observar redução das leveduras e hifas de *C. albicans*. Aumento original: **(C)** 1000x e **(D)** 3000x; **E-F)** *C. albicans* e tratamento com SM-F1 (15 mg/mL): verifica-se a

redução das leveduras e hifas semelhante ao tratamento com extrato bruto. Aumento original: **(E)** 1000x e **(F)** 3000x; **G-H)** *C. albicans* e tratamento com SM-F2 (10 mg/mL): verifica-se a redução das leveduras e expressiva redução das hifas. Aumento original: **(G)** 1000x, **(H)** 3000x.

Figura 23. Quantificação relativa (Log) da expressão dos genes CPH1, EFG1, HWP1, UME6 e YWP1 de *C. albicans* através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), quando em contato com o extrato bruto e SM-F2, após 24 horas de indução. Cada gene foi normalizado e comparado com o grupo controle (*C. albicans* + PBS). Os valores são expressos como média e desvio padrão. (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 24. Gráfico representando os valores de UFC/mL (Log_{10}) obtidos na formação de biofilme *in vitro* por *C. albicans* nos seguintes grupos: **A)** *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + Extrato Bruto (5 mg/mL); *C. albicans* + Extrato Bruto (10 mg/mL); *C. albicans* + Extrato Bruto (15 mg/mL). **B)** *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + SM-F1 (5 mg/mL); *C. albicans* + SM-F1 (10 mg/mL); *C. albicans* + SM-F1 (15 mg/mL). **C)** *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + SM-F2 (5 mg/mL); *C. albicans* + SM-F2 (10 mg/mL); *C. albicans* + SM-F2 (15 mg/mL). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *C. albicans*, em **A-B)** Grupo controle de *C. albicans* + PBS: observamos a presença de inúmeras leveduras e algumas hifas. Aumento original: **(A)** 1000X e **(B)** 3000x; **C-D)** *C. albicans* e tratamento com extrato bruto (15 mg/mL). Aumento original: **(C)** 1000x e **(D)** 3000x; **E-F)** *C. albicans* e

tratamento com SM-F1 (15 mg/mL). Aumento original: **(E)** 1000x e **(F)** 3000x; **(G-H)** *C. albicans* e tratamento com SM-F2 (15 mg/mL). Aumento original: **(G)** 1000x, **(H)** 3000x. É possível observar expressiva redução das leveduras e hifas de *C. albicans* em todos os tratamentos.

Figura 26. Demonstração da injeção do microrganismo em *G. mellonella* utilizando a seringa de Hamilton.

Figura 27. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* inoculadas com o extrato bruto nas concentrações de 1, 2, 5, 10 e 15 mg/ml.

Figura 28. 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.

Figura 29. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* para os diferentes grupos experimentais, sendo A) infecção por *C. albicans* e inoculação do extrato bruto fornecido profilaticamente ($p = 0,138$) nas concentrações de 10 mg/ml e 15 mg/ml e 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.

Figura 30. Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* com as frações SM-F1, SM-F2 e SM-F5 fornecidas terapêuticamente nas concentrações de 15 mg/ml e 30 mg/ml ($p < 0,0001$).

Figura 31. 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 12h, em que A) é a infecção por *C. albicans* e tratamento com extrato bruto, B) é a infecção por *C. albicans* e tratamento com SM-F1, C) é a infecção por *C. albicans* e tratamento com SM-F2, D) é a

infecção por *C. albicans* e tratamento com SM-F5. *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Figura 32. Média e desvio-padrão da contagem total de hemócitos das larvas de *G. mellonella* após 4h e 24h de infecção para os diferentes grupos experimentais, sendo 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 SMF-5, no tempo de 24h não havia nenhuma larva tratada viva. *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Figura 33. Contagem de UFC/ml após recuperação de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos imunossuprimidos, em que os valores de p são obtidos na comparação do grupo controle de *C. albicans* com os grupos com tratamento (Teste t de Student, $p \leq 0,05$).

Figura 34. Aspecto macroscópico do dorso das línguas dos camundongos dos grupos controle sem e com infecção por *C. albicans*, em que A) língua saudável. A papila valada ($\rightarrow$) separa a porção faríngea da língua. As papilas gigantes ($\blacktriangleright$) 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 ($\blacktriangle$) e atrofia papilar ($\downarrow$).

Figura 35. Aspecto macroscópico do dorso das línguas dos camundongos dos grupos tratados com sobrenadante e extrato bruto, em que 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 ($\blacktriangle$) e atrofia papilar ($\downarrow$) em menor

quantidade.

Figura 36. Aspecto macroscópico do dorso das línguas dos camundongos dos grupos tratados com as frações SM-F1 e SM-F2, em que 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.

Figura 37. Lesão de candidose no dorso da língua do camundongo inoculado com *C. albicans*, caracterizada por regiões esbranquiçadas e formação de pseudomembranas.

Figura 38. Escores e mediana dos grupos experimentais obtidos na análise macroscópica para cada animal (Krusal - Wallis = 0,023).

Figura 39. Corte sagital do dorso da língua dos camundongos, em que 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) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com SM-F2. Leveduras e hifas (↓) na queratina. PAS.

Figura 40. 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 = 0,086).

Figura 41. Corte sagital do dorso da língua dos camundongos, em que 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, espongirose, 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, espongirose e hiperplasia epitelial; e) Inoculação de *C. albicans* e tratamento com SM-F2, com presença de hiperqueratose HE.

Figura 42. Número de alterações epiteliais e medianas observadas nas lesões microscópicas de candidose no dorso da língua dos camundongos conforme diferentes grupos (Kruskal-Wallis = 0,0051).

Figura 43. 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).

Descrição detalhada da invenção:

[0019] A presente invenção refere-se a um método de obtenção de extrato bruto e frações de sobrenadante da cultura de *S. mutans* com atividade inibitória sobre *C. albicans*.

[0020] Dito método compreende as etapas de:

- a) Preparo do sobrenadante da cultura de *S. mutans*;
- b) Extração e fracionamento do sobrenadante da cultura de *S. mutans*;
- c) Identificação das substâncias presentes no extrato bruto e frações obtidas do sobrenadante da cultura

de *S. mutans*, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e uma etapa de derivação (sililação) das amostras.

[0021] Na etapa a) foi utilizada a cepa de *S. mutans* UA159 a qual foi preparada na proporção de 1 ml de cultura em 6 ml de caldo BHI e incubada durante 4 horas. O período de 4 horas revelou ser o ideal, pois demonstrou maiores inibições de *C. albicans* quando em contato com o sobrenadante da cultura de *S. mutans*.

[0022] Adicionalmente, na etapa b) a filtração foi realizada após o período de incubação para separação do caldo e das células de *S. mutans*, o que possibilitou a extração (3x) com acetato de etila. O solvente foi evaporado sob vácuo para a obtenção do extrato bruto, que foi fracionado em cinco frações (SM-F1 a SM-F5), mas em diferentes proporções de MeOH:H₂O (36:64, 49:51, 60:40, 76:24, 100:0), sendo a fração com melhor efeito a SM-F2 com 49% de MeOH e 51% de H₂O.

Na etapa c) foram identificadas as substâncias encontradas no extrato bruto e nas frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans* que revelaram ter eficácia contra *Candida*, principalmente contra a candidose bucal. Para comprovação da eficácia, foram realizados estudos *in vitro* como os ensaios de filamentação, formação de biofilmes e expressão de genes de virulência e estudos *in vivo* como os ensaios de candidose experimental no modelo de *Galleria mellonella* e em camundongos imunossuprimidos. Ditos ensaios revelaram que o extrato bruto e as frações de *S. mutans*, mais particularmente, a fração SM-F2 apresentou melhores efeitos inibitórios contra *C. albicans*.

[0023] Para a realização da presente invenção, cepas

padrão de *Streptococcus mutans* (UA 159) e de *Candida albicans* (ATCC 18804) foram mantidas em freezer a -80°C . Para ativação desses microrganismos, 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 CO_2) e a cepa de *C. albicans* foi cultivada em ágar Sabouraud (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C .

[0024] Mais particularmente, cada etapa do método é descrita a seguir:

Etapa a) Preparo do extrato e frações do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

[0025] Inicialmente, foi realizado o preparo de sobrenadante de *S. mutans*, em que a cepa foi incubada com caldo BHI suplementado com 5% de sacarose a 37°C por 24 h, sob condições de microaerofilia (5% de CO_2). Após esse período, as células microbianas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso 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 10^7 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 CO_2). Após este período, o caldo foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e filtrado em membrana com poros de diâmetro de $0,22\ \mu\text{m}$ (MFS, Dublin, EUA).

Etapa b) Extração e fracionamento do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

[0026] 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 (Figura 2) (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida (240 mBar) com auxílio de bomba de vácuo (D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments) e refrigeração a uma temperatura de 3°C (Marconi BTC-9090). Em seguida, os compostos que foram extraídos e ficaram retidos no balão foram coletados com metanol (MeOH) e o solvente evaporado com auxílio de uma bomba por aproximadamente 16 h (Figuras 3 e 4). A seguir, o material foi liofilizado (Figura 5) e pesado, obtendo-se o extrato bruto (Figura 6).

[0027] 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* (Tabela 1). As

frações SM-F3 e SM-F4 não foram utilizadas nos testes posteriores, pois não havia quantidade suficiente para realização dos ensaios experimentais.

Tabela 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	-

[0028] A partir do perfil obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) do extrato bruto, optou-se por submetê-lo ao fracionamento em coluna de sílica derivatizada C-18 (Figura 7) (150 g, $\Phi = 3,5$ cm) com diferentes soluções de MeOH:H₂O como eluente determinadas a partir do cromatograma do perfil, obtendo 5 frações (Tabela 2): SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4, SM-F5 (Figura 8).

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

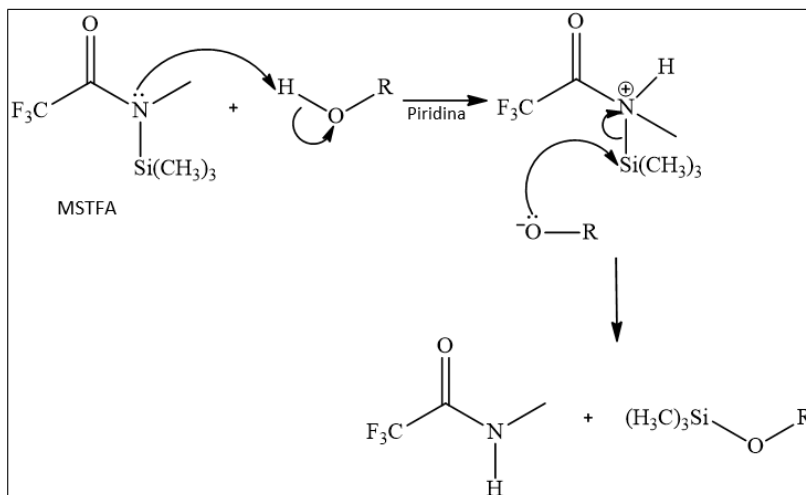
Fração	Proporção de MeOH:H₂O
SM-F1	36:64
SM-F2	49:51
SM-F3	60:40
SM-F4	76:24
SM-F5	100:0

Etapa c) Identificação das substâncias presentes no

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

[0029] Para a identificação das substâncias do extrato bruto e das frações obtidas foi realizada cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG-EM, Shimadzu, modelo GC-MS-QP2020 com autoinjeter AOC-20i. A coluna utilizada para as análises foi Supelco RTX-5MS (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, em que as condições cromatográficas eram: 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 por 3 min, seguido de rampa de temperatura de 3°C/min até 260°C, se mantendo nessa temperatura por mais 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 foi realizada uma etapa de derivação (sililação) durante o preparo das amostras. Esta etapa consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupos -OH, -SH, -NH e -COOH dos metabólitos por grupos trimetilsilil (TMS) de forma a obter derivados com menor polaridade, maior volatilidade e estabilidade térmica (Pellatti, Benvenuti, 2007).

Mecanismo para a reação de sililação (exemplificada para um álcool)



[0030] 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).

[0031] As Figuras 9 a 11 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 crescimento de *S. mutans*), enquanto as Figuras 12 a 15 apresentam os cromatogramas do controle, SM-EB, SM-F1 e SM-F2, com a numeração dos seus respectivos picos.

[0032] A partir dos resultados de CG-EM foi possível identificar os constituintes de SM-EB, SM-F1, SM-F2 e do controle, 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 3-6), sendo que substâncias com uma porcentagem de similaridade inferior a 85% foram desconsideradas.

Tabela 3 - Identificação das substâncias presentes no

controle por CG-EM.

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
2	7.140	Ácido láctico (TMS)	93%
5	13.105	2-feniletanol (TMS)	93%
6	13.913	Ácido benzóico (TMS)	90%
7	15.621	Glicerol (TMS)	93%
8	16.092	Ácido fenilacético (TMS)	96%
10	18.131	Uracila (TMS)	92%
12	20.479	Etanolamina (TMS)	87%
13	21.092	Ácido 3-fenilpropanóico (TMS)	95%
29	27.589	Tirosol (TMS)	90%
59	39.957	Piridoxina (TMS)	94%
60	40.405	2,5 dicetopiperazina - ciclo-(Leu-Pro)	90%
71	43.529	Glicopirranose (TMS)	96%
72	44.225	Xantina (TMS) XANTHINE-TRI-TMS	86%
73	44.327	Ácido hexadecanóico ou palmítico (TMS)	91%
88	50.354	Ácido octadecanóico ou esteárico (TMS)	85%
93	53.678	(Z)-9-Octadecenamida	92%
94	54.171	2,5 dicetopiperazina - ciclo-(Phe-Pro)	92%
105	65.149	2,5-dicetopiperazina - ciclo-(Phe-Phe)	85%
106	66.345	triptofano (TMS)	86%

TMS - grupo trimetilsilil

Tabela 4 - Identificação das substâncias presentes no extrato bruto por CG-EM

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
2	7.138	Ácido láctico (TMS)	95%
4	13.102	2-feniletanol (TMS)	93%
5	13.912	Ácido benzóico (TMS)	93%
6	14.685	Ácido octanóico (TMS)	91%
7	15.619	Glicerol (TMS)	93%
8	16.088	Ácido fenilacético (TMS)	97%
11	18.128	Uracila (TMS)	92%
13	20.478	Etanolamina (TMS)	90%
14	21.088	Ácido 3-fenilpropanóico (TMS)	95%
29	27.583	Tirosol (TMS)	91%
68	39.953	Piridoxina (TMS)	94%
69	40.435	2,5 dicetopiperazina - ciclo- (Leu-Pro)	90%
78	44.218	Xantina (TMS)	89%
79	44.317	Ácido hexadecanóico ou palmítico (TMS)	90
95	50.346	Ácido octadecanóico ou esteárico (TMS)	87%
101	53.677	9-Octadecenamida	93%
102	54.183	2,5 dicetopiperazina - ciclo- (Phe-Pro)	92%
104	56.682	Uridina (TMS)	86%
117	66.338	triptofano (TMS)	85%

TMS - grupo trimetilsilil

Tabela 5 - Identificação das substâncias presentes na fração

SM-F1 por CG-EM.

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
3	7.146	Ácido láctico (TMS)	94%
5	13.922	Ácido benzóico (TMS)	93%
6	15.629	Glicerol (TMS)	93%
7	16.096	Ácido fenilacético (TMS)	98%
9	18.058	Ácido glicérico (TMS)	94%
10	18.137	Uracila (TMS)	92%
12	20.128	3-Metilpiperazina-2,5-diona (TMS)	93%
13	20.488	Etanolamina (TMS)	89%
14	20.845	Timina (TMS)	88%
15	21.099	Ácido 3-fenilpropanóico (TMS)	95%
30	27.595	Tirosol (TMS)	92%
55	39.965	Piridoxina (TMS)	94%
56	40.420	2,5 dicetopiperazina - ciclo-(Leu-Pro)	90%
59	41.499	Glicose (TMS)	89%
62	44.236	Xantina (TMS)	90%
83	54.120	2,5 dicetopiperazina - ciclo-(Phe-Pro)	90%

TMS - grupo trimetilsilil

Tabela 6 - Identificação das substâncias presentes na fração

SM-F2 por CG-EM.

Pico	T _R (min)	Nome da substância	Similaridade
5	7.115	Ácido láctico (TMS)	94%
6	13.075	2-feniletanol (TMS)	93%
7	14.875	Ácido nicotínico (TMS)	92%

8	15.593	Glicerol (TMS)	93%
41	40.352	2,5 dicetopiperazina - ciclo-(Leu-Pro)	89%
54	44.295	Ácido hexadecanóico ou palmítico (TMS)	88%
66	50.325	Ácido octadecanóico ou esteárico (TMS)	86%
73	53.708	9-Octadecenamida	93%
74	54.296	2,5 dicetopiperazina - ciclo-(Phe-Pro)	91%

TMS - grupo trimetilsilil

[0033] Assim, ao analisar os cromatogramas (Figuras 9, 12 e 13), bem como as Tabelas 3 e 4 foi possível verificar que o extrato de SM-EB (extrato bruto) e o controle apresentam picos com os mesmos tempos de retenção (T_R), no entanto, SM-EB apresentou as substâncias ácido octanóico ($T_R = 14,685$ min) e uridina ($T_R = 56,682$ min), que não foram identificadas no controle. Já a comparação dos cromatogramas da fração SM-F1 e do controle (Figura 10) indicou a presença de picos em SM-F1 ($T_R = 53,123$; $55,172$; $55,457$; $55,842$; $56,229$; $58,102$ min) que não foram observados no controle, porém não foi possível a identificação dos mesmos. Entre as substâncias identificadas na fração SM-F1 (Figura 14 e Tabela 5) e que diferem do controle é válido destacar o ácido glicérico ($T_R = 18,058$ min) e a 3-metilpiperazina-2,5-diona ($T_R = 20,128$ min). A fração SM-F2 (Tabela 6 e Figuras 11 e 15), apresentou um menor número de substâncias identificadas, contudo é possível destacar o ácido nicotínico ($T_R = 14,875$ min), substância que não foi identificada no controle.

[0034] A partir do alto número de picos em todos os cromatogramas, foi possível apenas a identificação de algumas substâncias, já que a similaridade era muito baixa quando os mesmos eram comparados com possíveis substâncias descritas nas bases de dados. Adicionalmente, não existe um número grande de substâncias de extrato de microorganismos identificadas e inseridas na base de dados. Por fim, apesar de algumas substâncias terem sido identificadas, ainda existe a possibilidade de algumas serem inéditas, por isso, estas não foram objeto de identificação mais pormenorizada nessa invenção.

[0035] Em adição, como observado nas Tabelas 3 a 6, as substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle. Nesse sentido, é necessário esforços de pesquisas complementares de modo a isolar, identificar e verificar qual (is) substância (s) exerce (m) a atividade antifúngica, sendo que pode haver um sinergismo entre duas ou mais substâncias que potencializam a atividade antifúngica.

Testes realizados para comprovação da atividade antifúngica

Testes in vitro

Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a filamentação de *C. albicans* analisados por Microscopia Óptica

Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans*

[0036] *C. albicans* foi cultivada a 37°C por 24 h em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco, Detroit, EUA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. Após o período de crescimento, procedeu-se à centrifugação da

cultura a 2000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi ressuspenso em PBS, caracterizando a etapa de lavagem das células. Esse procedimento foi realizado novamente, e em seguida o precipitado celular foi ressuspenso em caldo YNB. A concentração microbiana foi determinada espectrofotometricamente (B582, Micronal, São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda 530 nm e densidade óptica de 0,381, obtendo-se uma concentração de 10^7 células/mL de *C. albicans*.

Ensaio de filamentação de *C. albicans*

[0037] Após o preparo da suspensão padronizada de *C. albicans* conforme descrito anteriormente, em uma placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, NY, EUA) foi adicionado 1 mL de água destilada estéril suplementada com 10% de soro fetal bovino a fim de induzir a filamentação e 100 µL da suspensão padronizada de *C. albicans*. A seguir, em cada poço foram adicionados 50 µL do extrato bruto ou 50 µL das frações SM-F1 ou SM-F2, preparados nas concentrações de 1-15 mg/mL. No grupo controle, foi adicionado PBS. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. Após 24 h de incubação, 50 µL do inóculo contido em cada poço da placa foi disperso sobre lâminas de microscopia, com 10 campos demarcados em seu verso. O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e observado em microscópio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Alemanha) com aumento de 400x. As imagens foram analisadas quanto aos aspectos morfológico e quantitativo. Para quantificação das hifas presentes, foram analisados 10 campos microscópicos em cada lâmina, totalizando 100 campos

para cada amostra, sendo padronizado o ponto médio de cada campo. Em cada campo microscópico foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presentes, atribuindo-se os seguintes escores: 0, ausência de hifas; 1, de 1 a 10; 2, de 11 a 20; 3, de 21 a 30; 4, de 31 a 40; 5, mais de 40. O ensaio foi realizado em duplicata, ou seja, duas repetições biológicas com cinco repetições por grupo na placa.

[0038] Esse ensaio foi realizado testando apenas os efeitos do extrato bruto sobre as hifas de *C. albicans*, em diferentes concentrações: 1, 2, 5, 10 e 15 mg/mL. No grupo controle, sem tratamento, foi adicionado PBS. Na análise microscópica não foi observada redução das hifas quando em contato com extrato bruto nas concentrações de 1 e 2 mg/mL em comparação ao grupo controle *C. albicans* e PBS. Porém, nas concentrações 5, 10 e 15 mg/mL foi observada a redução na filamentação de *C. albicans* (Figura 16), verificando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado com extrato na concentração de 5 mg/mL comparado ao grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 17). Desse modo, analisando esses dados, é demonstrado que o extrato bruto foi capaz de inibir a formação de hifas de *C. albicans*.

[0039] Em seguida, ao investigar a ação das frações, verificou que quando em contato com a fração SM-F1 (5 mg/mL), as células de *C. albicans* formaram inúmeras hifas semelhante ao perfil exibido pelo grupo controle de *C. albicans* e PBS. Nas concentrações 10 e 15 mg/mL, observamos redução da filamentação, apresentando frouxidão na rede de hifas, comparadas ao controle (Figura 18). Após a análise quantitativa dos escores, verificou-se que a fração SM-F1 apresentou capacidade de reduzir as hifas nas concentrações

de 10 e 15 mg/mL, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 19).

[0040] Entretanto, quando *C. albicans* esteve em contato com a fração SM-F2, foi observado uma inibição no número de hifas em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL) em relação ao controle *C. albicans* e PBS (Figura 20). Redução na quantidade das hifas, com diferença estatisticamente significativa, foi observada ao comparar o grupo tratado com a fração SM-F2 na concentração de 10 mg/mL com o grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 21).

Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a filamentação de *C. albicans*, analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

[0041] Discos de resina acrílica medindo 5 mm de diâmetro e 3 mm de espessura foram depositados no fundo de cada poço da placa de 24 poços e em seguida foi realizado o ensaio da filamentação, conforme previamente descrito. Após 24 h de incubação, os discos foram removidos dos poços e colocados em outra placa contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5%, para serem fixados. A placa foi mantida a 37°C por 1 h. Depois disso, os discos foram removidos do glutaraldeído e mantidos a 37°C por 24 h para completa secagem. Em seguida, foram transferidos para stubs de alumínio e receberam uma camada de 12 nm de liga de ouro (Au), em metalizadora EMITECH SC7620 Sputter Coater (East Sussex, United Kingdom). Em seguida, os discos foram submetidos a alto vácuo e analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect S50 (FEI, República Tcheca). O ensaio foi realizado em duplicata, com três ensaios por grupo.

[0042] Em seguida, foram confirmados os efeitos inibitórios nas hifas de *C. albicans* causados pelo extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2. Desse modo, os grupos analisados foram o extrato bruto, as frações SM-F1 e SM-F2, nas concentrações de cada composto em que houve maior inibição da filamentação de acordo com os resultados obtidos no ensaio de microscopia óptica, sendo 5 mg/mL para o extrato bruto, 15 mg/mL para a SM-F1 e 10 mg/mL para a SM-F2. Como grupo controle sem tratamento, foi utilizado PBS.

[0043] Pode ser observado nas imagens de MEV a presença de grande quantidade de leveduras e rede de hifas bastante extensa e compactada no grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 22, **A** - 1000x e **B** - 3000x). Nas imagens em que *C. albicans* esteve em contato com o extrato bruto, foi observado que houve redução no número de hifas, bem como na quantidade de leveduras (Figura 22, **C** - 1000x e **D** - 3000x). Redução destas estruturas também foi observada na presença da SM-F1 (Figura 22, **E** - 1000x e **F** - 3000x), enquanto na presença da SM-F2, foi observado praticamente a inexistência das hifas, bem como uma expressiva redução das células leveduriformes. Nestas imagens foi possível observar a presença de vários espaços livres sobre os discos, evidenciando uma importante redução de *C. albicans* (Figura 22, **G** - 1000x e **H** - 3000x). As imagens mostram que o extrato bruto e as frações SM-F1 e principalmente, a SM-F2 possuem ação antifúngica sobre *C. albicans*.

Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a expressão de genes de virulência de *C. albicans*

[0044] Foi utilizado o modelo de filamentação, descrito previamente, para avaliar o perfil de expressão dos

genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1* de *C. albicans* quando expostos ao extrato bruto e a fração SM-F2, nas concentrações em que houve maior inibição das hifas conforme o ensaio quantitativo, 5 e 10 mg/mL, respectivamente. Desse modo, após o período de incubação de 24 h a suspensão celular de *C. albicans* foi coletada em tubo falcon e centrifugada a 4700 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* coletado com Trizol (Ambion, Inc, AM1926, Waltham, Ma, EUA) e armazenado em eppendorf livre de RNase para posterior extração de RNA. Posteriormente, 1 mL do reagente Trizol foi adicionado em um poço da placa de 24 poços e distribuído em todos os poços, coletando completamente as células aderidas nos poços. O material coletado foi armazenado em eppendorf livre de RNase para posterior extração e quantificação total do RNA, utilizando *primers* para PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

[0045] Nesse ensaio, foi utilizado o modelo de filamentação descrito anteriormente, utilizando as concentrações de cada composto que apresentam maior capacidade inibitória sobre as hifas conforme os resultados obtidos no ensaio de microscopia óptica, sendo 5 mg/ml para o extrato bruto e 10 mg/ml para a SM-F2. Como grupo controle, sem tratamento, foi utilizado PBS.

[0046] Os resultados médios de quantificação relativa (RQ) de todos os genes alvos na presença do extrato bruto e SM-F2 estão demonstrados na Figura 23.

[0047] De acordo com os resultados, os genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1* e *UME6* foram regulados negativamente ("down-regulated") quando expostos ao extrato bruto e a SM-F2, apresentando redução estatística significativa quando

comparados ao grupo controle sem tratamento. Em relação ao gene *CPH1*, ocorreu a diminuição na sua expressão de 4 vezes ($p < 0,0001$) para o tratamento com o extrato bruto e 9,26 vezes quando tratado com a SM-F2 ($p < 0,0001$). Para o gene *EFG1* ocorreu a diminuição na sua expressão em 1,3 vezes ($p = 0,0066$) para o tratamento com o extrato bruto e 4 vezes quando tratado com a SM-F2 ($p < 0,0001$). O gene *HWP1* apresentou diminuição na sua expressão em 10,15 vezes ($p < 0,0001$) para o tratamento com o extrato bruto e 23,1 vezes quando tratado com a SM-F2 ($p < 0,0001$). O gene *UME6* apresentou diminuição na sua expressão em 9,45 vezes ($p < 0,0001$) para o tratamento com o extrato bruto e 10,6 vezes quando tratado com a SM-F2 ($p < 0,0001$). Por outro lado, aumentos significativos nos níveis de expressão do gene *YWP1* ("up-regulated") foram observados para ambos os tratamentos, com extrato bruto e SM-F2, respectivamente. Aumentos nos níveis de expressão desse gene foram de 20,22 vezes ($p < 0,0001$) para o tratamento com o extrato bruto e 11,2 vezes quando tratado com a SM-F2 ($p = 0,0036$), comparados ao controle. Os genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1* e *UME6* estão envolvidos na morfogênese de *C. albicans*, e sua expressão desempenha papel chave na formação das hifas, que consiste em um importante fator de virulência. De acordo com os resultados, nós verificamos que a SM-F2 apresentou ação inibitória maior sobre esses importantes genes de virulência de *C. albicans* em relação ao tratamento com o extrato bruto. Em contrapartida, quando submetido ao tratamento com extrato bruto, o gene *YWP1*, o qual está envolvido no mecanismo de dispersão das leveduras, apresentou nível de expressão gênica superior ao tratamento com a SM-F2. Portanto, constata-se que tanto o extrato bruto

como a SM-F2 foram capazes de induzir os genes de virulência de *C. albicans*.

Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre biofilmes de *C. albicans*

Formação dos Biofilmes

[0048] Para a realização desse experimento, após o crescimento em caldo, a cepa de *C. albicans* foi centrifugada para o preparo da suspensão padronizada contendo 10^7 células por mL conforme descrito anteriormente. A formação dos biofilmes foi realizada conforme as metodologias descritas por Thein et al. (2006) e Barbosa et al. (2016), com algumas modificações. Os biofilmes foram formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano (Costar Corning, Nova York, NY, EUA). Desse modo, inicialmente foram inoculados em cada poço 100 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans* contendo 10^7 células/mL. A placa foi incubada em agitação a 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo, SP, Brasil), a 37°C por 90 min para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após esta etapa, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado, delicadamente, duas vezes com PBS, para remoção das células não aderidas.

[0049] Em cada poço da placa, foram adicionados 50 μ L do extrato bruto ou 50 μ L das frações SM-F1 ou SM-F2 (5, 10 e 15 mg/mL), solubilizados em água destilada estéril. No grupo controle, foi adicionado PBS. Para a promoção do crescimento do biofilme, 200 μ L de YNB suplementado com 100 mM de glicose (diluído 10 vezes em água destilada estéril) foi adicionado a cada poço. A placa foi tampada e incubada em agitação a 75 rpm, a 37°C por 48 h. Quando atingido o período de 24 h, o caldo foi removido, os poços foram

lavados, delicadamente, com PBS e novo meio YNB (200 µL) foi adicionado. Nesta etapa de troca do meio, foram adicionados 50 µL do extrato bruto ou 50 µL das frações SM-F1 ou SM-F2, bem como 50 µL do controle PBS. A seguir, a placa foi incubada novamente em agitação a 75 rpm a 37°C até completar as 48 h. O ensaio foi realizado em duplicata, com oito repetições por grupo na placa.

Análise dos biofilmes por quantificação do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)

[0050] Completadas as 48 h de formação do biofilme, os poços foram lavados delicadamente com PBS. A seguir, foi adicionado em cada poço 250 µL de PBS e o biofilme formado no fundo da placa foi desprendido utilizando-se homogeneizador ultrassônico (Sonics Vibra Cell) por 30 s, com potência de 50 W. Em seguida, a partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas (1:10), e alíquotas de 10 µL das diluições desejadas foram plaqueadas em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol para contagem de *C. albicans*. Após, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 h e em seguida, as colônias foram contadas para determinar o número de UFC/mL.

[0051] Foram observadas taxas de redução nas contagens de UFC/mL de *C. albicans* quando o biofilme esteve em contato com o extrato bruto em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL), em relação ao grupo controle *C. albicans* e PBS. Houve redução estatisticamente significativa entre os grupos analisados, sendo 2,79 Log para o extrato bruto na concentração de 5 mg/mL ($p < 0,0001$), 7,02 Log para a concentração de 10 mg/mL ($p < 0,0001$) e, redução total, 7,82 Log, para a concentração de 15 mg/mL (Figura 24A). Quando o

biofilme esteve em contato com a fração SM-F1, houve redução estatisticamente significativa entre os grupos analisados, sendo 1,85 Log para a concentração de 5 mg/mL ($p < 0,0001$), 2,02 Log para a concentração de 10 mg/mL ($p < 0,0001$) e 2,59 Log, para a concentração de 15 mg/mL ($p < 0,0001$) (Figura 24B). Quando em contato com a fração SM-F2, também houve redução das contagens de UFC/mL em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL), comparadas ao grupo controle *C. albicans* e PBS. Houve redução estatisticamente significativa entre os grupos analisados, sendo 2,80 Log para a SM-F2 na concentração de 5 mg/mL ($p < 0,0001$), 2,95 Log para a concentração de 10 mg/mL ($p < 0,0001$) e, 5,98 Log, para a concentração de 15 mg/mL ($p = 0,0007$) (Figura 24C).

Análise dos biofilmes de *C. albicans* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

[0052] Para a MEV, os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica (5 mm de diâmetro e 3 mm de espessura) depositados no fundo de cada poço da placa de 24 poços e em seguida foi realizado o ensaio de formação dos biofilmes, conforme previamente detalhado. Após 48 h de incubação, os discos foram removidos dos poços e colocados em outra placa contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5%, para serem fixados. A placa foi mantida a 37°C por 1 h. Depois disso, os discos foram removidos do glutaraldeído e desidratados com lavagens crescentes de etanol (10, 25, 50, 75 e 90%) por 20 min cada, seguido por imersão em álcool absoluto por 1 h. As placas foram mantidas a 37°C por 24 h para completa secagem dos discos. Em seguida, foram transferidos para stubs de alumínio e receberam uma camada de 12 nm de liga de ouro (Au), em metalizadora EMITECH SC7620

Sputter Coater (East Sussex, United Kingdom). Em seguida, os discos foram submetidos a alto vácuo e analisados em Microscópio Eletrônico de Varredura Inspect S50 (FEI, República Tcheca). O ensaio foi realizado em duplicata, com três biofilmes por grupo.

[0053] Os biofilmes formados quando tratados com extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2 nas concentrações em que houve maior redução na contagem de UFC/mL (15 mg/mL) também foram avaliados por MEV. Nos biofilmes controle formados apenas por *C. albicans* e PBS, observamos a formação de um biofilme maduro nos discos de resina acrílica após 48 h de incubação, apresentando grande quantidade de leveduras e algumas hifas (Figura 25, **A** - 1000x e **B** - 3000x). Nos biofilmes tratados com extrato bruto (Figura 25, **C** - 1000x e **D** - 3000x) e com a SM-F2 (Figura 25, **E** - 1000x e **F** - 3000x) observamos redução praticamente total das células leveduriformes e nenhuma hifa formada. Nos biofilmes tratados com a SM-F1 (Figura 25, **G** - 1000x e **H** - 3000x) também observamos redução bastante significativa das leveduras e a inexistência de hifas. As imagens do MEV concordam com os resultados obtidos na contagem de UFC/mL e evidenciam o potencial antifúngico do extrato bruto e das frações SM-F1 e SM-F2.

Testes in vivo

Análise da atividade antifúngica do extrato bruto e frações de *S. mutans* sobre o crescimento de *C. albicans* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima

[0054] 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 hemocitômetro. 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 do extrato bruto e das frações SM-F1, SM-F2 e SM-F5. 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. Apenas o extrato bruto e a fração SM-F2 obtiveram atividade inibitória até a concentração testada, sendo 10 mg/mL e 15 mg/mL, respectivamente.

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

Preparo da suspensão padronizada de *Candida albicans*

[0055] Para preparar a suspensão padronizada de *Candida albicans*, esta 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 ressuspensionado 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)

Injeção dos microrganismos em *G. mellonella*

[0056] Posteriormente, os microrganismos foram injetados em *G. mellonella*, isto é, um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última prolegue esquerda (Figura 25). 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 injetados 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.

[0057] 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.

[0058] 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. A figura 26 demonstra a injeção do microrganismo em *G. mellonella* utilizando a seringa de Hamilton.

Determinação da curva de sobrevivência de *G. mellonella*

[0059] 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.

[0060] Quanto aos resultados, para a análise estatística dos 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)* utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Primeiramente foi analisada a toxicidade do extrato bruto sobre as larvas de *G. mellonella* (Figura 27), não sendo 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 28).

[0061] 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.

[0062] 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 sobrevida das larvas com a utilização profilática do extrato (Figura 29A), 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 29B) houve um aumento da sobrevida 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).

[0063] Como não houve efeito profilático para o extrato bruto, as frações foram administradas apenas terapêuticamente. 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 30).

Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/ml

[0064] 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*. 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.

[0065] A análise dos dados da contagem de UFC/mL de *Candida* presente na hemolinfa de *G. mellonella* foi feita pela Análise de Variância, Teste de Tukey ou *t* de Student utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5%. Através dos resultados obtidos verificou-se haver um comportamento semelhante no crescimento de *C. albicans* em todos os grupos experimentais (Figura 22). 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. 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 (Log₁₀) para o extrato bruto de 10 mg/mL e 1,5 UFC/mL (Log₁₀) 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 (Log₁₀) e 0,90 UFC/mL (Log₁₀) 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. A Figura 31 apresenta a média e desvio-padrão da contagem de UFC/ml (Log₁₀) de *C. albicans* para os diferentes grupos experimentais nos tempos 0, 4, 8, e 12h.

Estudo de densidade hemocitária

[0066] Para o estudo de densidade hemocitária, 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 3 larvas para coleta de hemolinfa. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo foram utilizadas 18 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.

[0067] Em todos os grupos tratados foi observado maior número na contagem de hemócitos em relação ao grupo apenas infectado. Além disso, foi realizada análise estatística através da Análise de Variância, Teste de Tukey ou *t* de Student, utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5%. Foi verificado 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 32).

[0068] 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.

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

[0069] 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.

[0070] Em relação aos 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).

[0071] A linha do tempo com a distribuição dos dias e seus respectivos experimentos para a indução da candidose bucal em camundongos está representada na Tabela 7.

Tabela 7. Linha do tempo com a distribuição dos dias e seus respectivos experimentos

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

[0072] 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, EUA) 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.

Imunossupressão e administração de tetraciclina

[0073] 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 adaptáveis à presente invenção.

Preparo da suspensão de *C. albicans*

[0074] 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).

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*

[0075] 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 10^9 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.

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

[0076] 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.

[0077] 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 e Análise de Variância utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5% conforme demonstrado na Tabela 8. 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 demonstram que os tratamentos, principalmente com a SM-F2, foram capazes de diminuir a colonização de *C. albicans* da cavidade bucal dos camundongos imunossuprimidos (Figura 33).

Tabela 8. 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	$3,256 \pm 0,32$	2,944	3,079	3,643	0,0363
Sobrenadante	$2,543 \pm 0,40$	1,954	2,653	2,987	
Extrato bruto	$2,415 \pm 0,21$	2,079	2,431	2,623	
Fração 1	$2,653 \pm 0,83$	1,699	2,898	3,435	
Fração 2	$2,343 \pm 0,41$	1,602	2,491	2,613	

Eutanásia dos animais

[0078] 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.

Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

[0079] 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.

[0080] A análise macroscópica revelou que todos os grupos inoculados com suspensões de *C. albicans* apresentaram lesões de candidose sobre o dorso da língua. 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 34-37). Para avaliação estatística dos escores obtidos na

análise macroscópica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. 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 38). Houve melhora para o tratamento com o sobrenadante e com a fração SM-F1, sendo mais evidente para este último tratamento.

Análise microscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

[0081] 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 μ m 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.

[0082] 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, exocitose, 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).

[0083] Em resumo, 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 através dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. 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 39). 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. A mediana dos escores foi de 3 para o grupo sem tratamento e de 0 para o extrato bruto e fração SM-F2 (Figura 40). Também foi verificada melhora com o sobrenadante e a fração SM-F1, os quais tiveram mediana dos escores de 1.

[0084] 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 espongiose (Figura 41). 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 42).

[0085] 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 43).

[0086] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Referências

- 1-Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(9):1378-83.
- 2-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.

3-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.

4-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.

5-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.

6-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.

7-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.

8-Borghesi 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.

9-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>.

10-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.

11-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.

12-Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):447-65.

13-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.

14-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.

15-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.

16-Dhamgaye S, Qu Y, Peleg AY. Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cell Microbiol.* 2016;18(12): 1716-22.

17-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.

18-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.

19-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.

20-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>

21-Filoché S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010;89(1):8-18.

22-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.

23-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.

24-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.

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.

26-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.

27-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.

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

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

30-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.

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

32-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.

33-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.

34-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.

35-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.

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

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

38-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.

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

40-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.

41-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

42-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.

43-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.

44-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.

45-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.

46-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.

47-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.

48-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.

49-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.

- 50-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.
- 51-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>.
- 52-Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(4):247-65.
- 53-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.
- 54-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.
- 55-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.
- 56-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.
- 57-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.
- 58-Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important

bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010;8(5):340-9.

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

60-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>

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

62-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.

63-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.

64- 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.

65-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.

66-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.

67-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.

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

69-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.

70-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>.

71-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.

72-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

73-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.

74-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

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

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

77-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.

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

79-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.

80-Thein ZN, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini

review. *Mycoses*. 2009;52(6):467-75.

81-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.

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

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

84-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.

85-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.

86-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.

87-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.

88-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.

89-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.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de obtenção do extrato e frações do sobrenadante de *S. mutans*, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- a) Preparo do sobrenadante da cultura de *S. mutans*;
- b) Extração e fracionamento do sobrenadante da cultura de *S. mutans* e
- c) Identificação das substâncias presentes no extrato bruto e frações obtidas do sobrenadante da cultura de *S. mutans* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa a), compreende incubar 1 ml de suspensão com uma concentração de 10^7 células/mL de *S. mutans* contendo 6 mL de caldo BHI a 37°C por 4 horas em estufa sob 5% de CO₂.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que, após a incubação, o caldo foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos e filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa b) compreende submeter o sobrenadante à extração com acetato de etila por 3 vezes, remover o solvente orgânico sob vácuo em evaporador rotatório e sob pressão reduzida de 240 mBar e refrigeração a uma temperatura de 3°C, evaporar o solvente, liofilizar e pesar o extrato bruto obtido.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o extrato obtido foi fracionado em coluna de sílica derivatizada C-18 com soluções de MeOH:H₂O na

proporção de 36:64, 49:51, 60:40, 76:24 e 100:0 para obtenção das frações do sobrenadante de *S. mutans*.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que as frações do sobrenadante de *S. mutans* obtidas são selecionadas do grupo que compreende SM-F1, SMF-2, SM-F3, SM-F4 e SM-F5, mais preferivelmente SM-F1 e SM-F2.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a fração SMF-2 apresenta 49% de MeOH e 51% de H₂O.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que na etapa c) compreende identificação das substâncias por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas nas seguintes condições: 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 por 3 min, seguido de rampa de temperatura de 3°C/min até 260°C, se mantendo nessa temperatura por mais 10 min.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que na etapa c) adicionalmente compreende uma etapa de derivação.

10. Uso do extrato e frações do sobrenadante de *S. mutans* obtidos de acordo com o método definido nas reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que é na preparação de uma formulação farmacêutica para tratar candidose.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a candidose é preferivelmente candidose bucal.

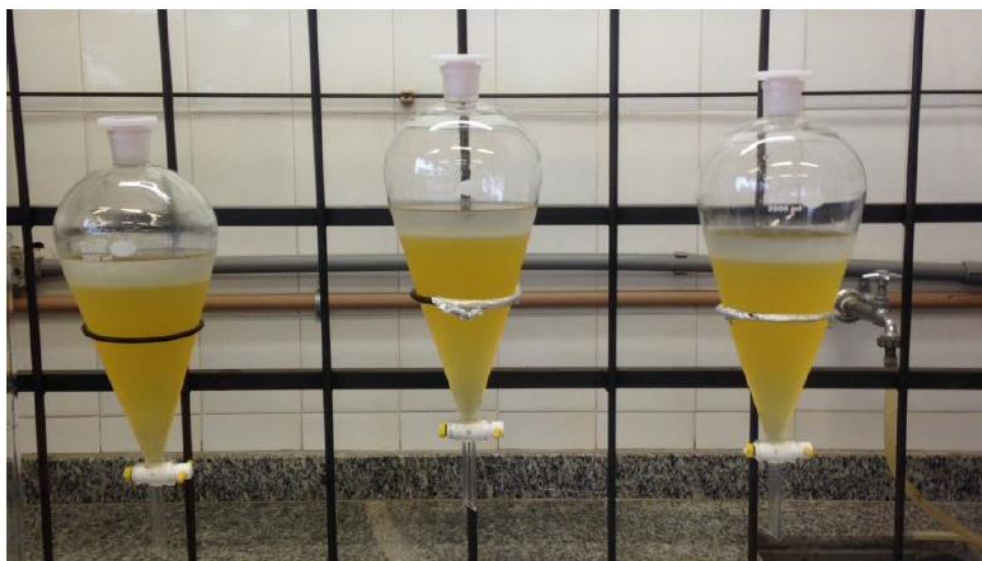


Figura 1



Figura 2

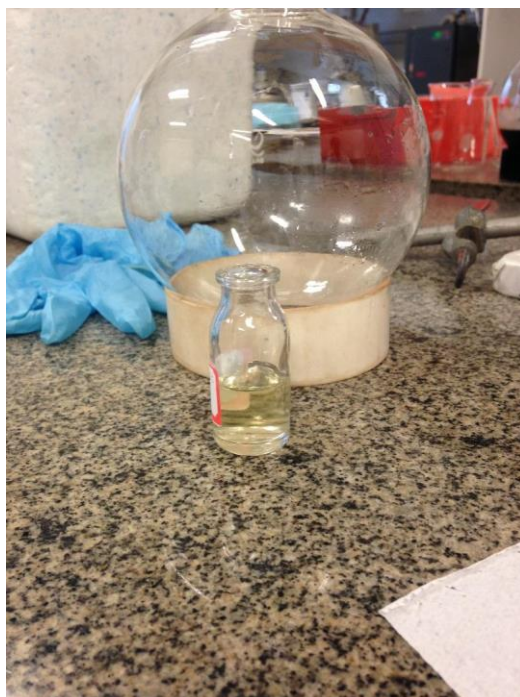


Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6

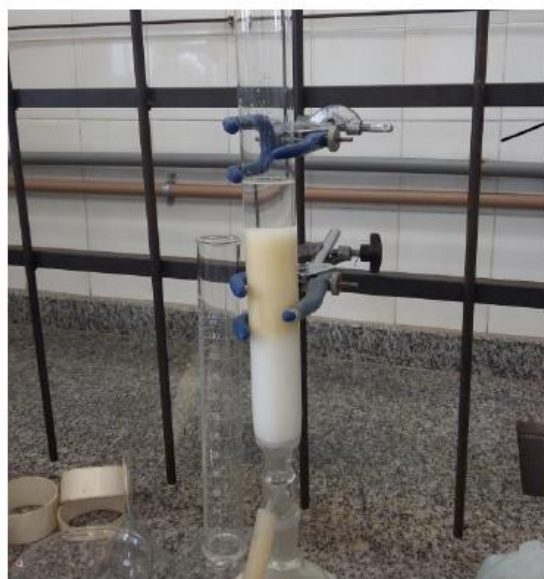


Figura 7



Figura 8

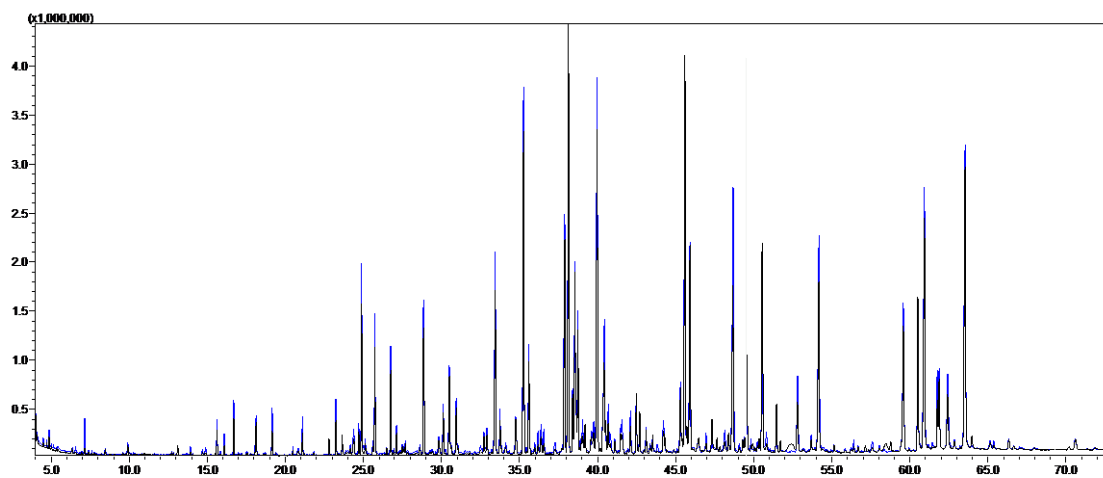


Figura 9

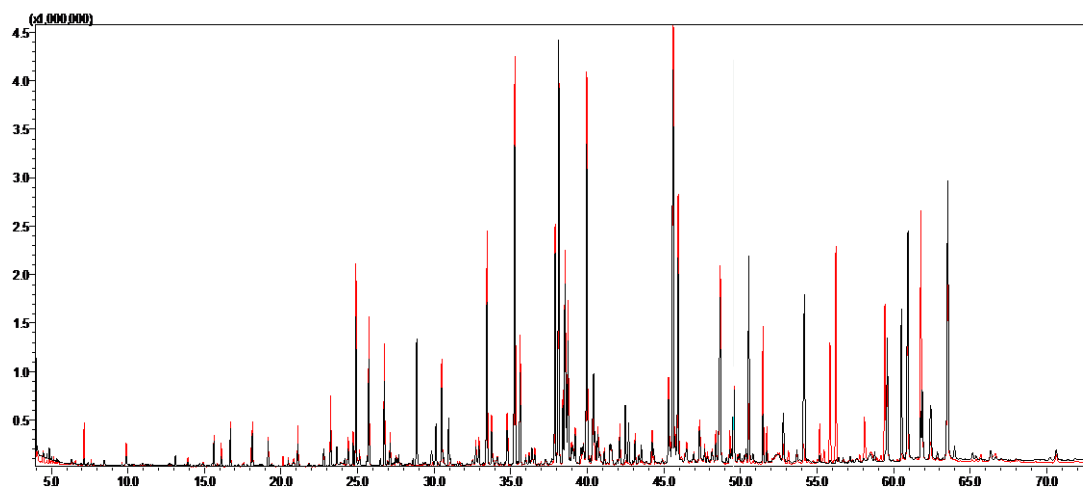


Figura 10

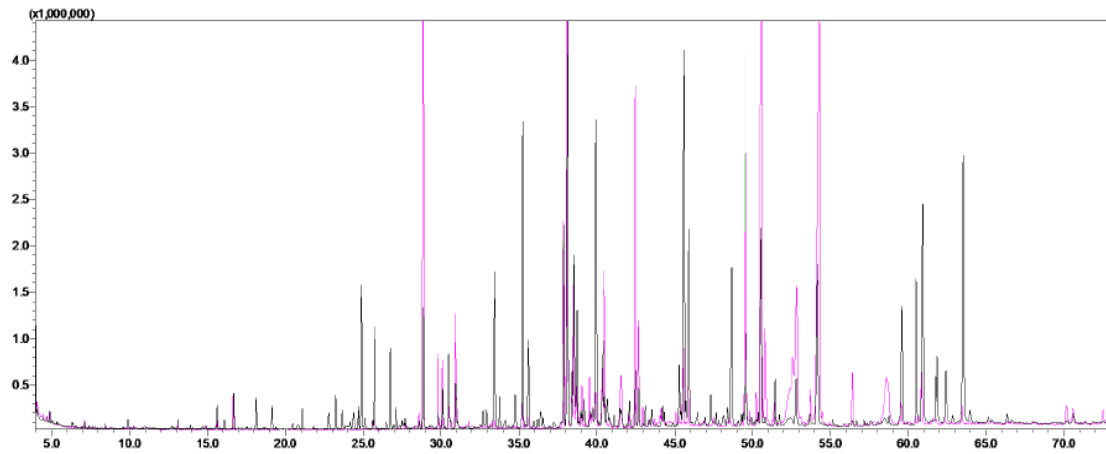


Figura 11

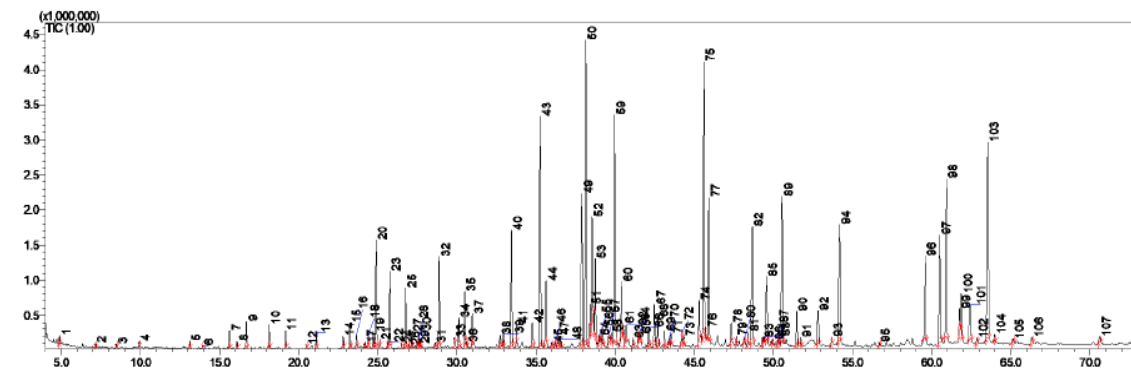


Figura 12

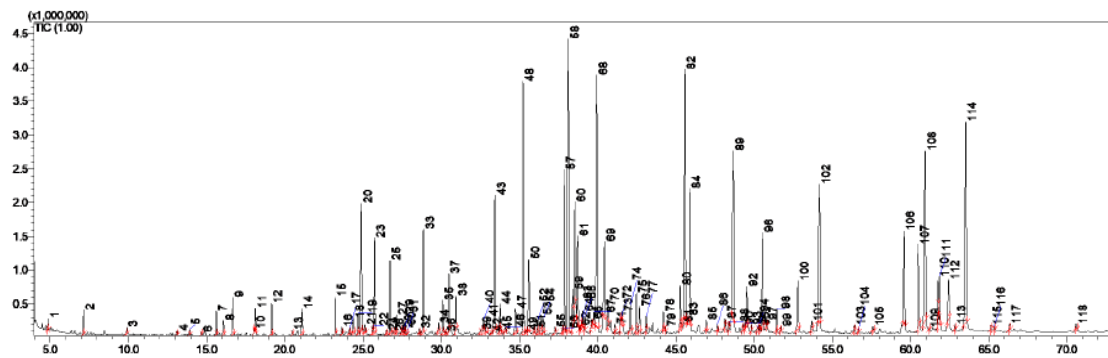


Figura 13

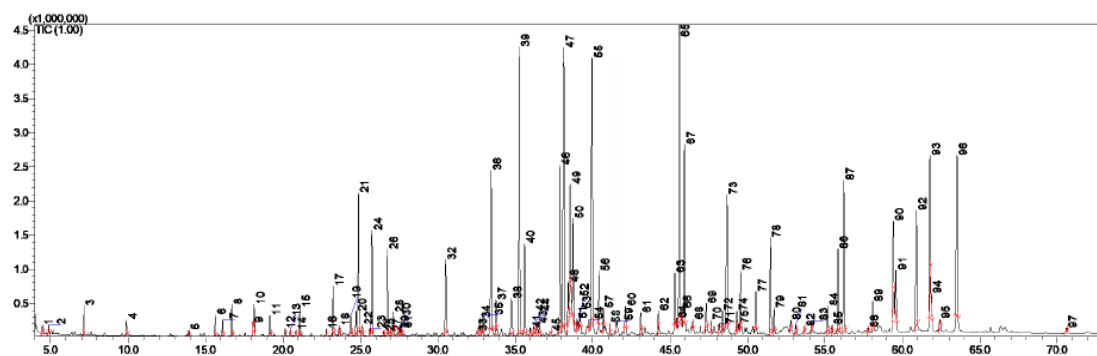
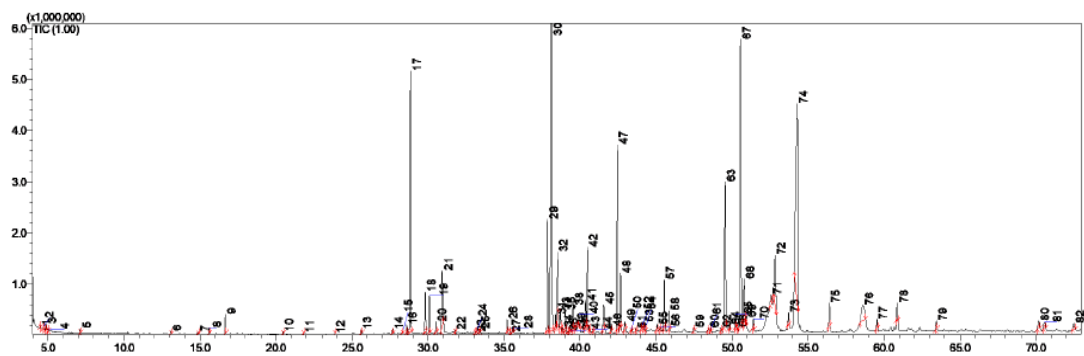
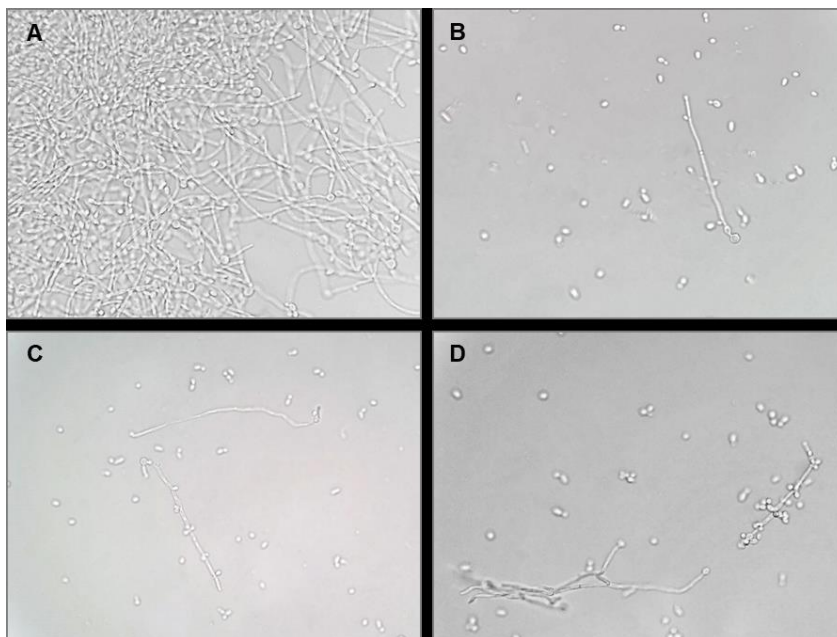


Figura 14

**Figura 15****Figura 16**

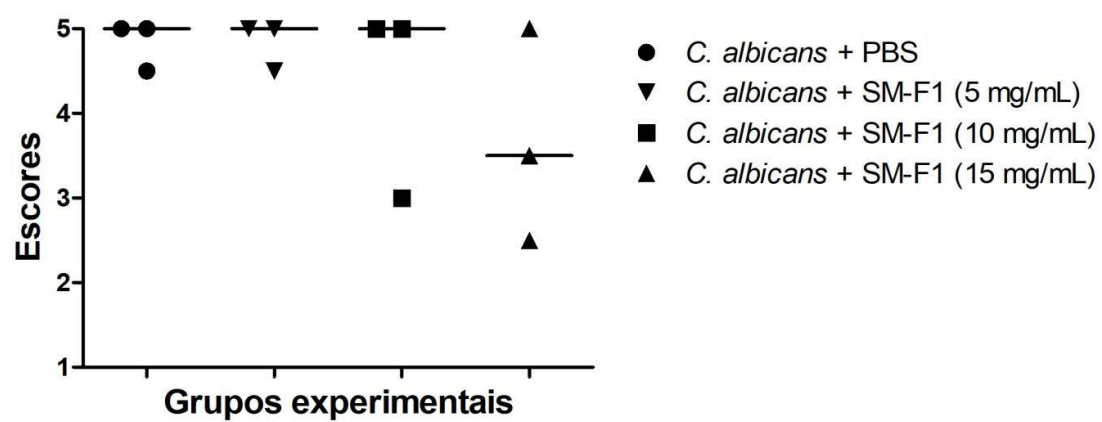


Figura 19

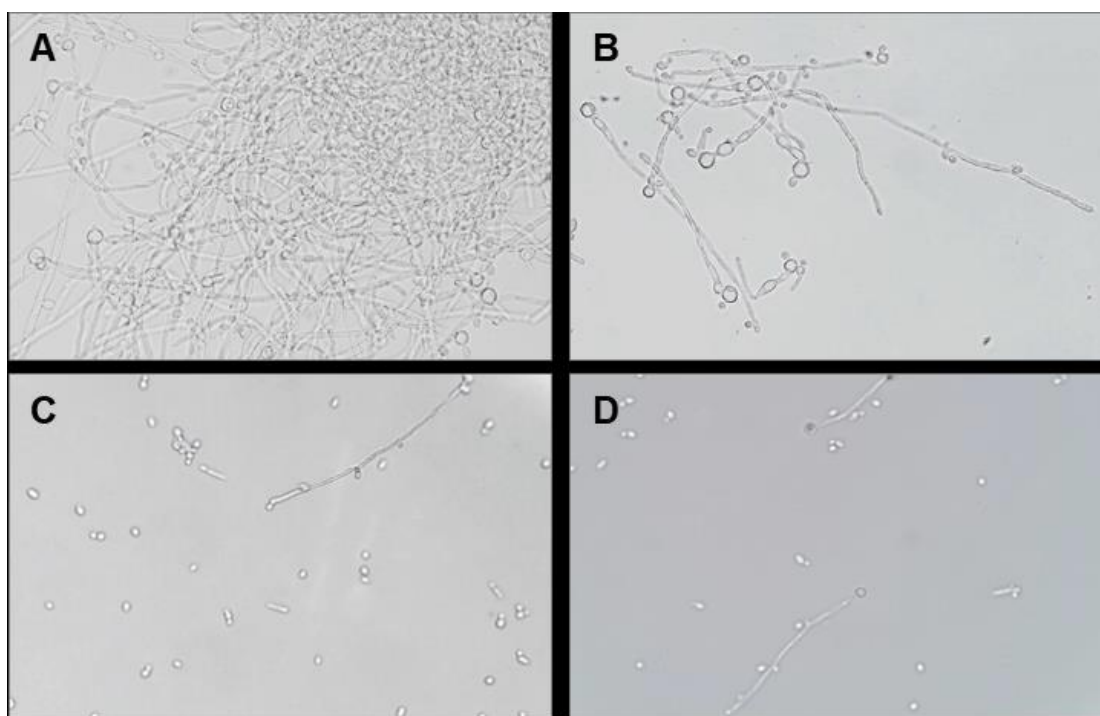


Figura 20

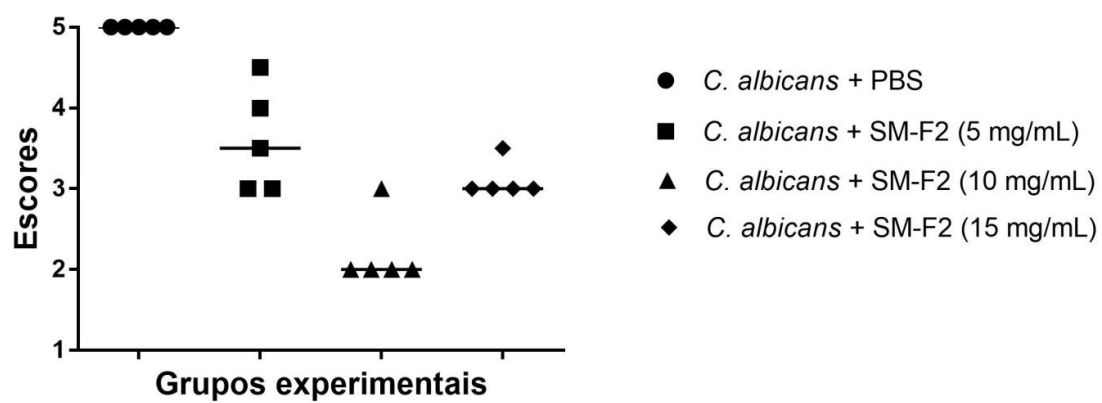


Figura 21

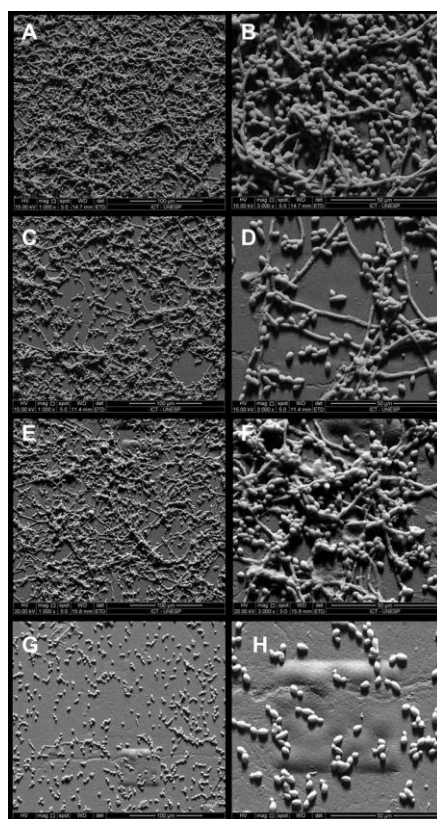


Figura 22

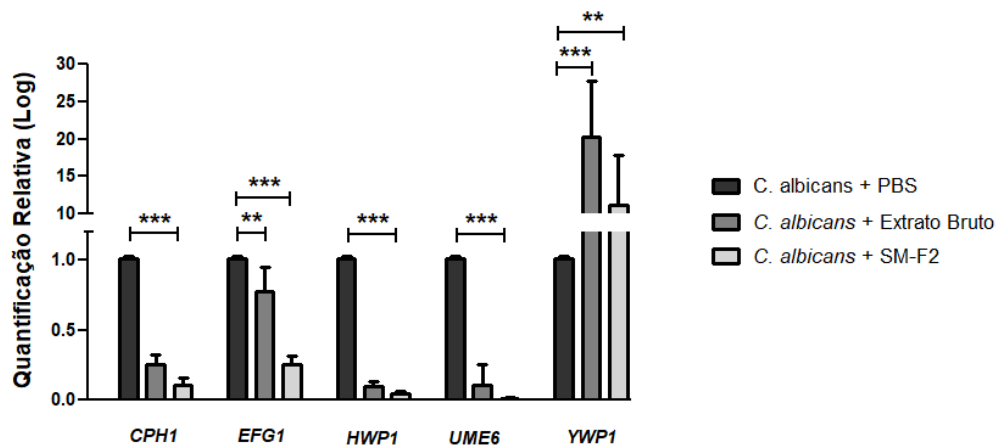
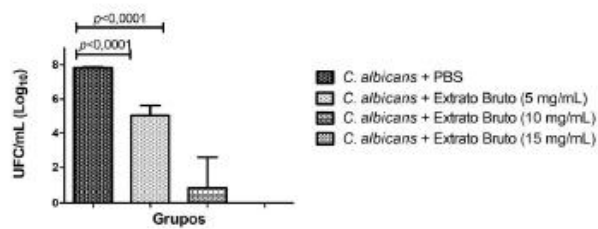
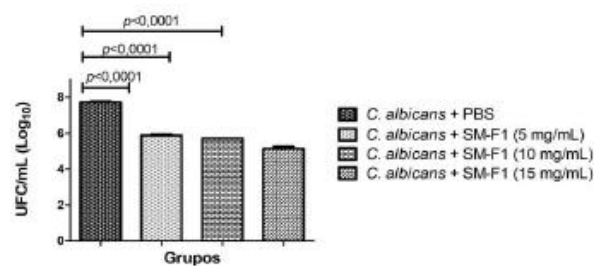


Figura 23

A)



B)



C)

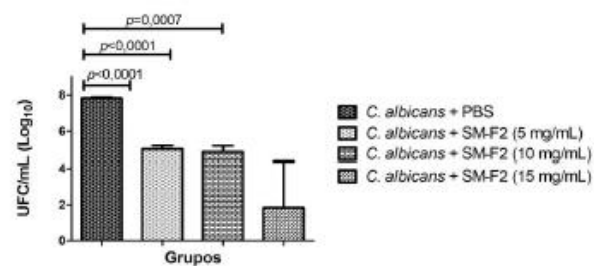


Figura 24

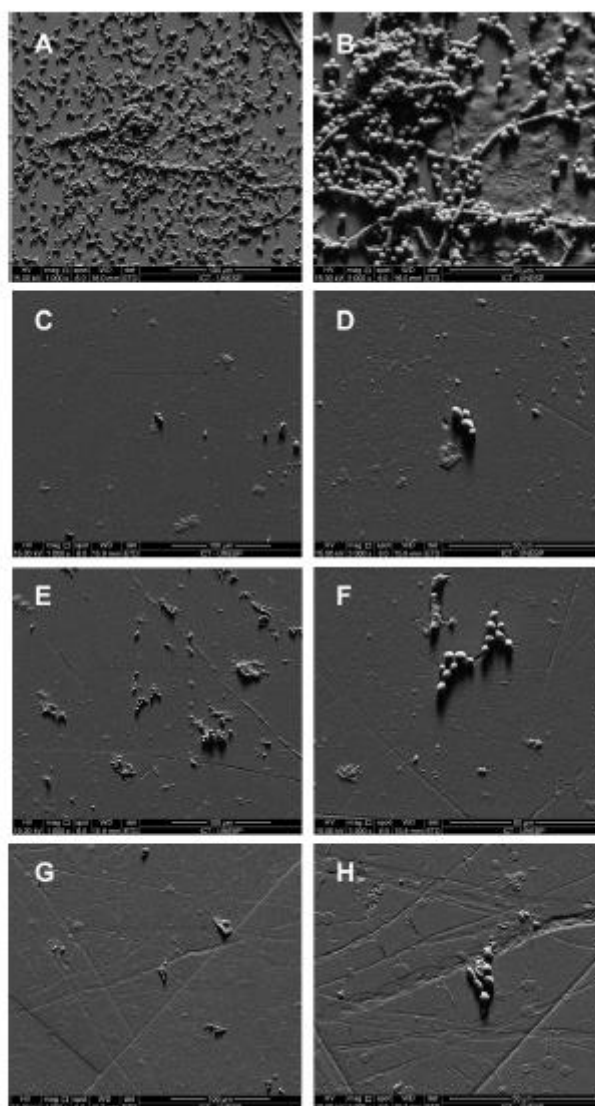


Figura 25



Figura 26

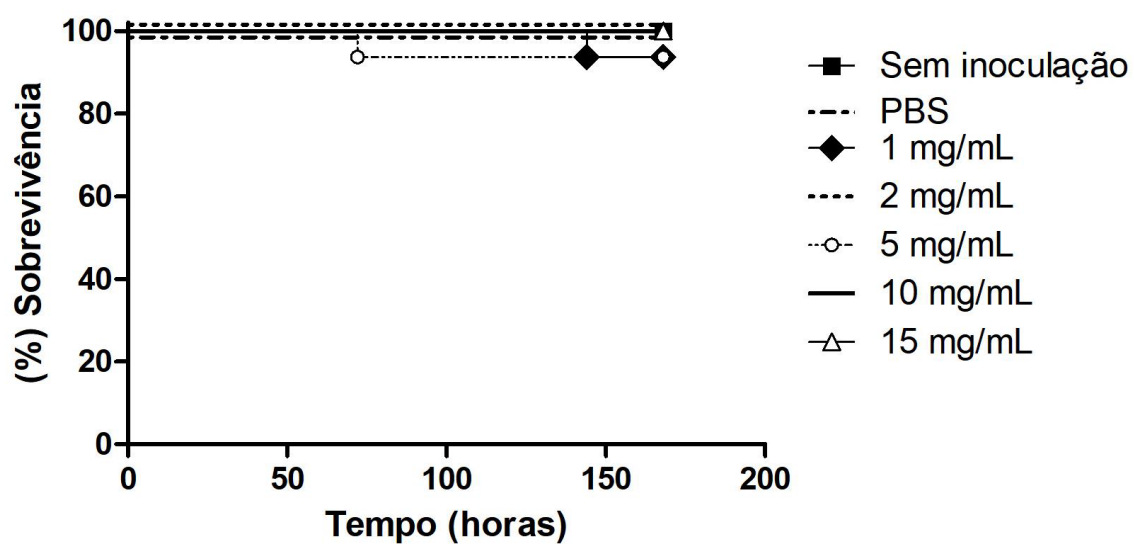


Figura 27

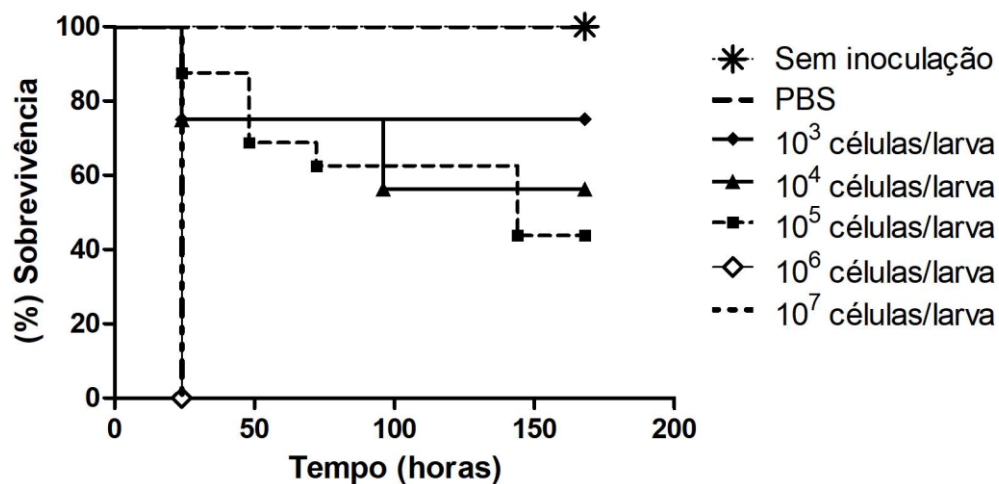


Figura 28

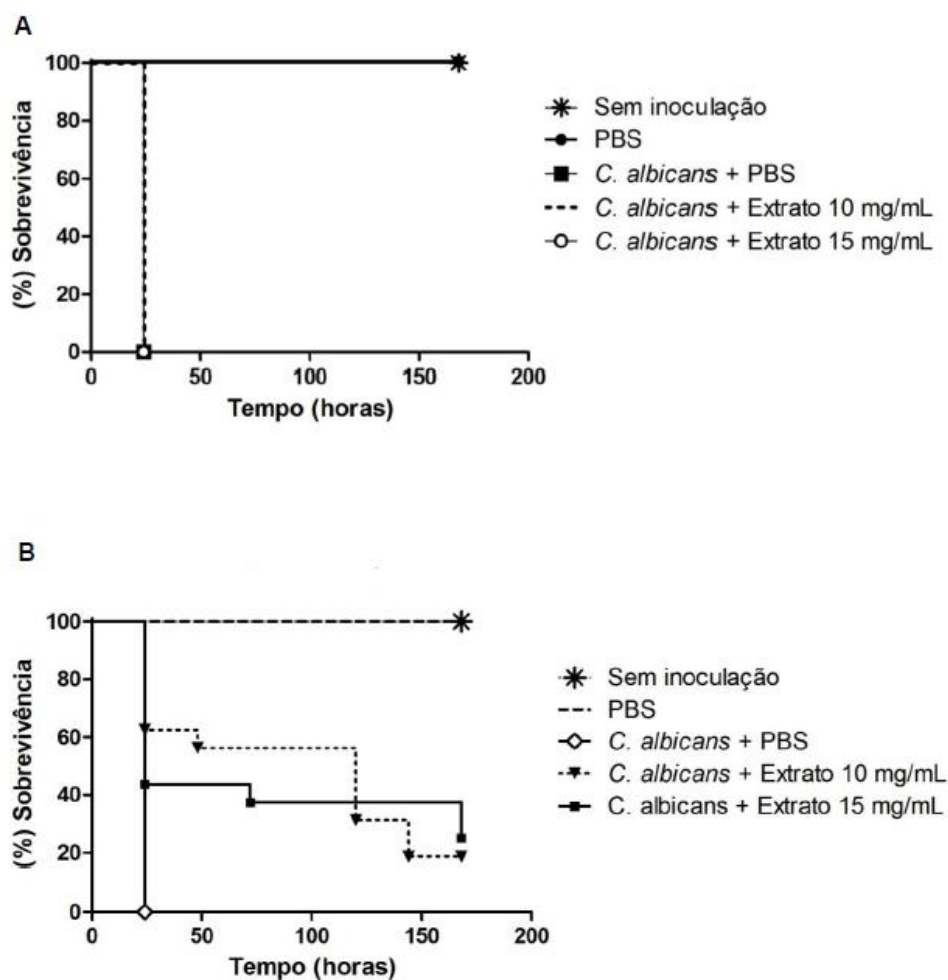


Figura 29

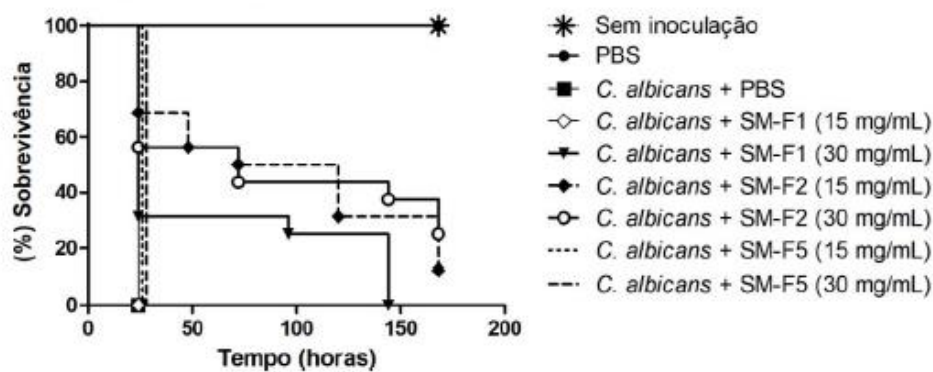


Figura 30

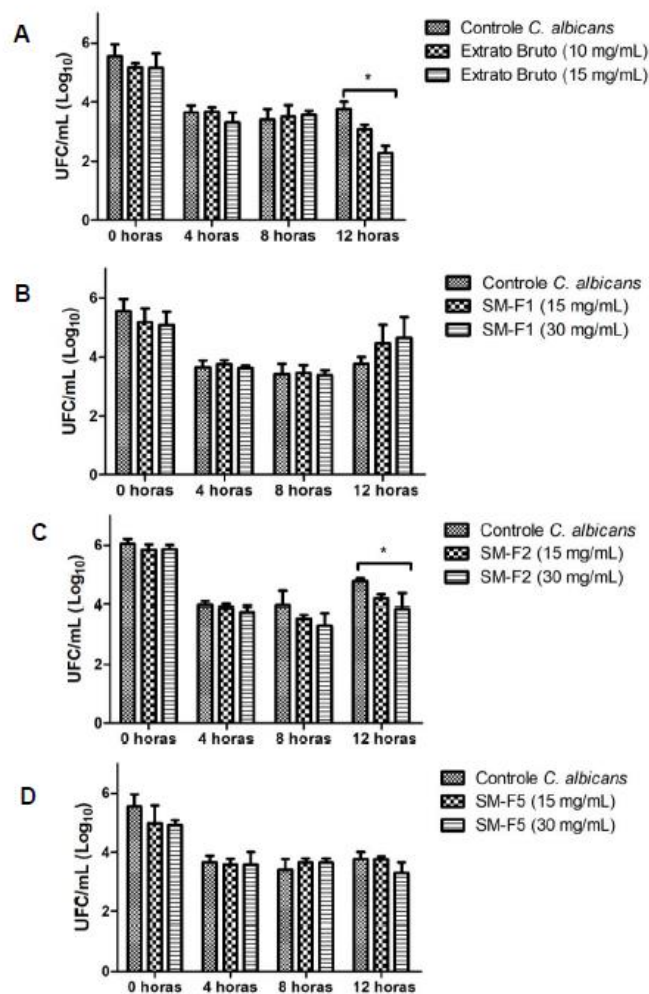


Figura 31

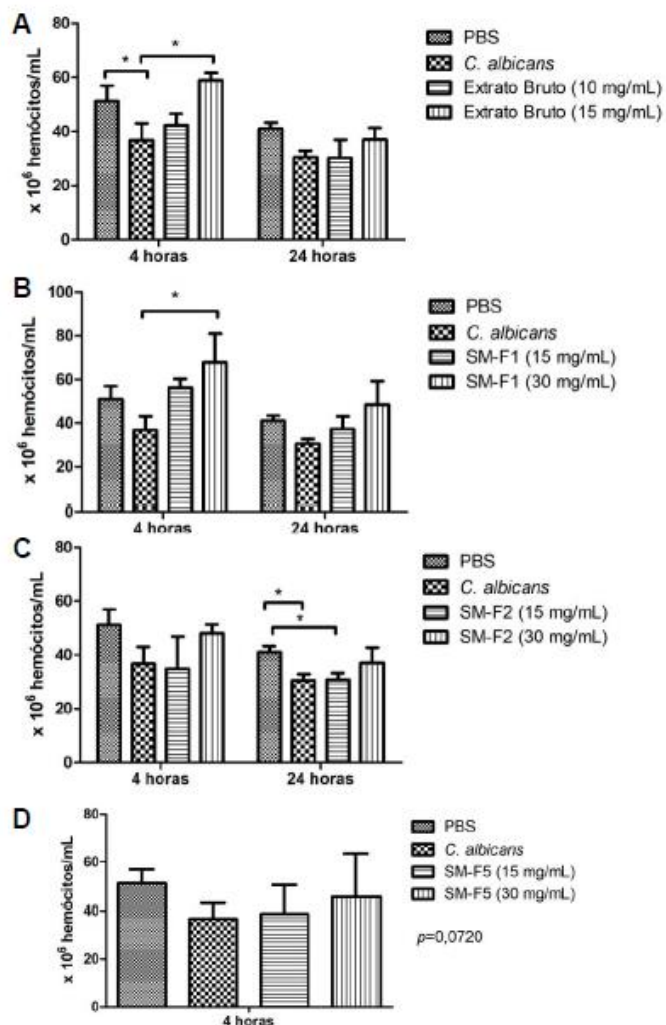


Figura 32

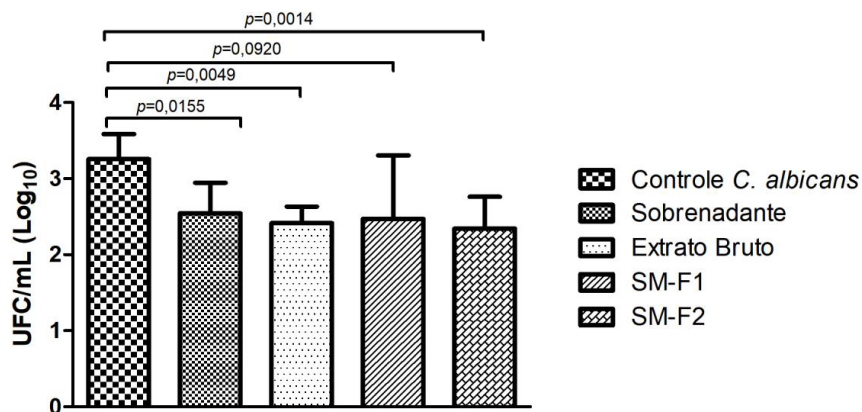


Figura 33

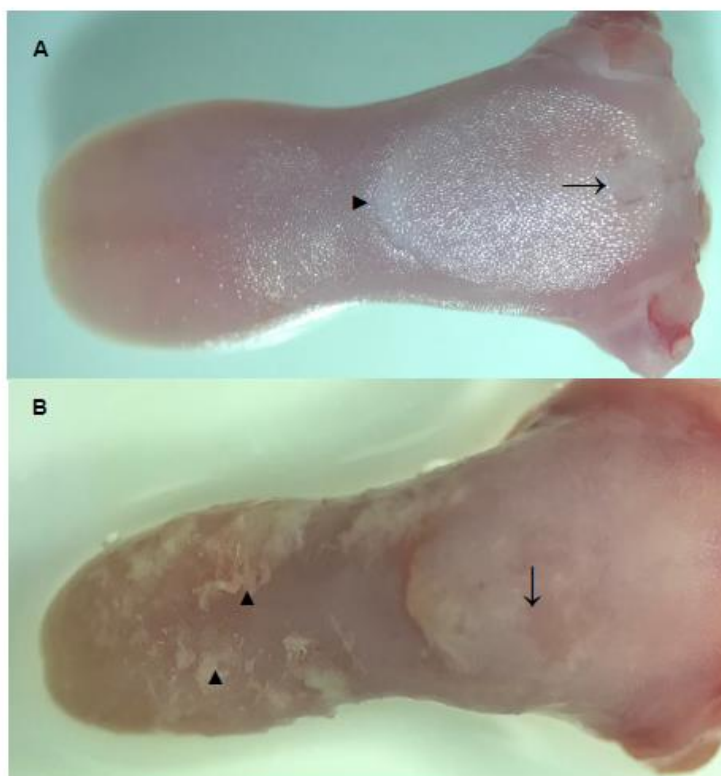


Figura 34

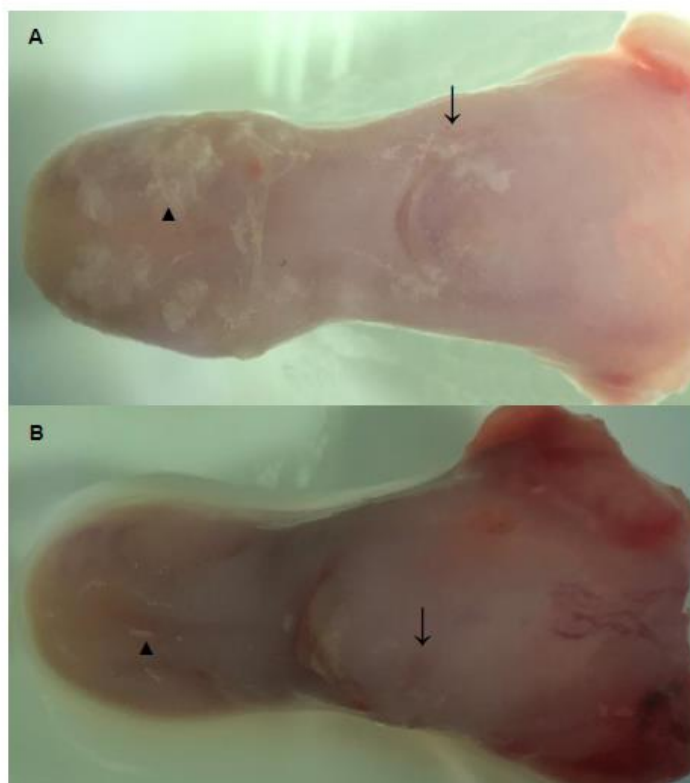


Figura 35

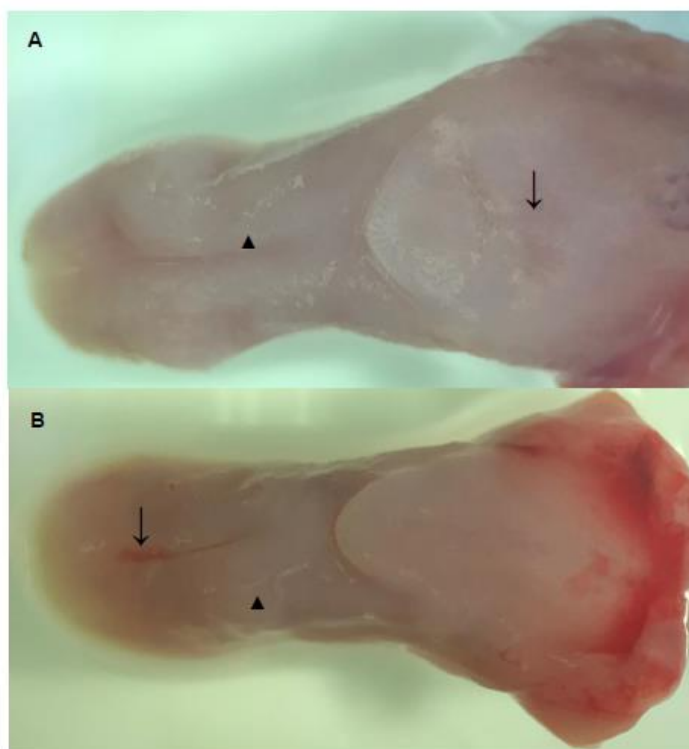


Figura 36



Figura 37

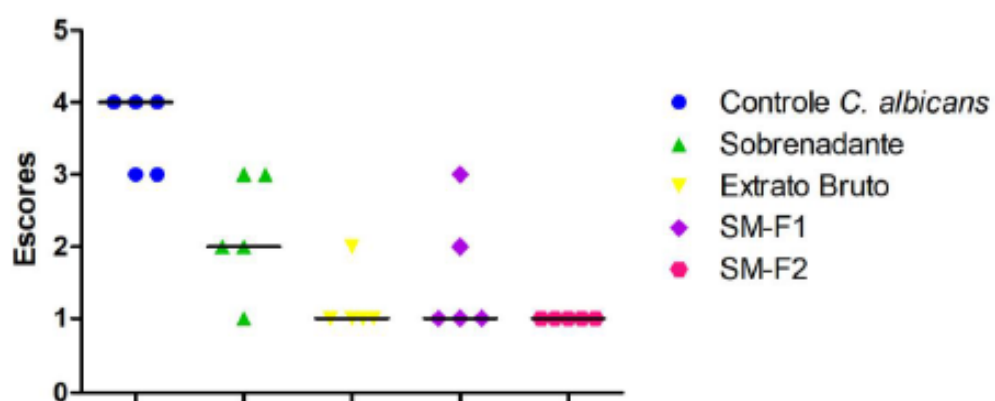


Figura 38

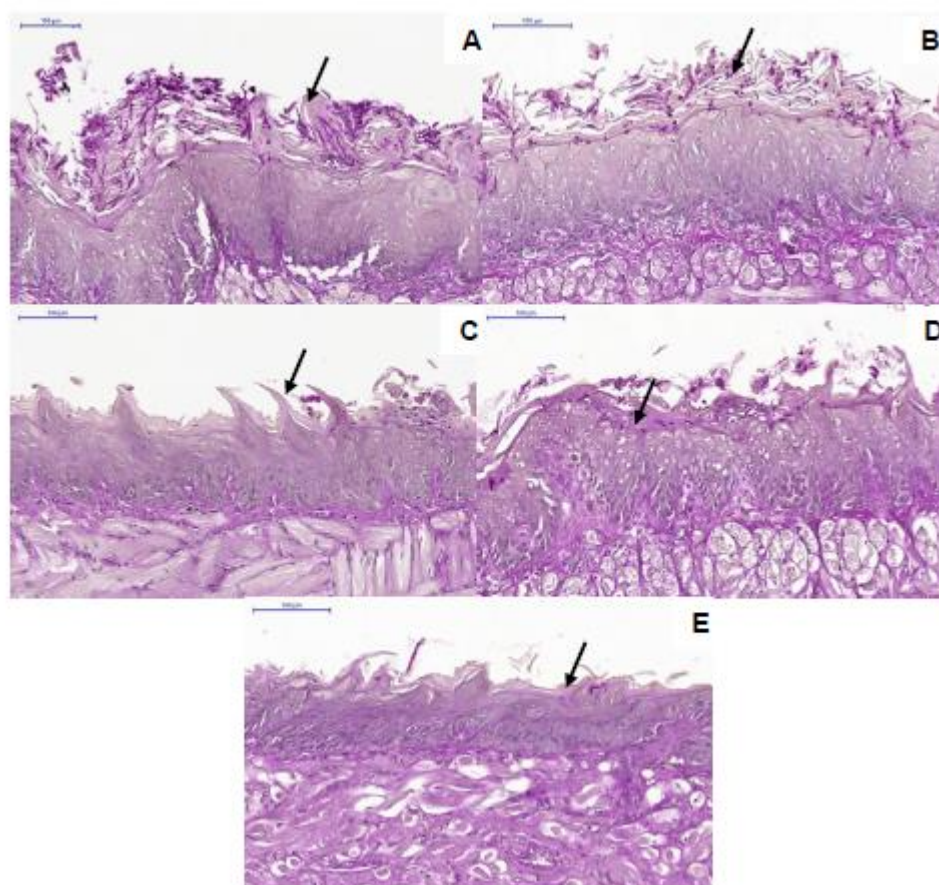


Figura 39

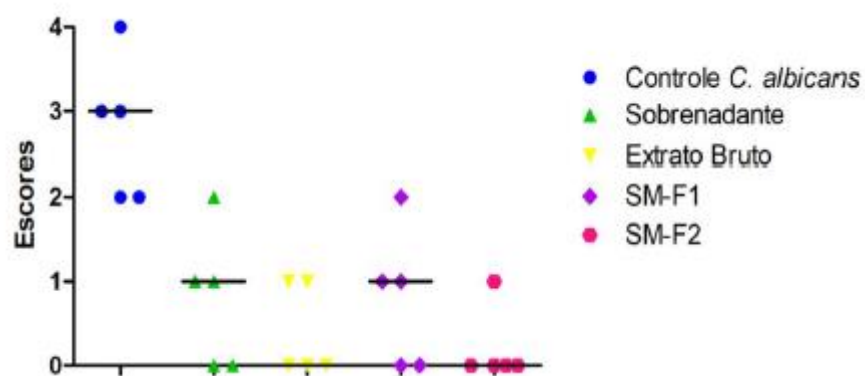


Figura 40

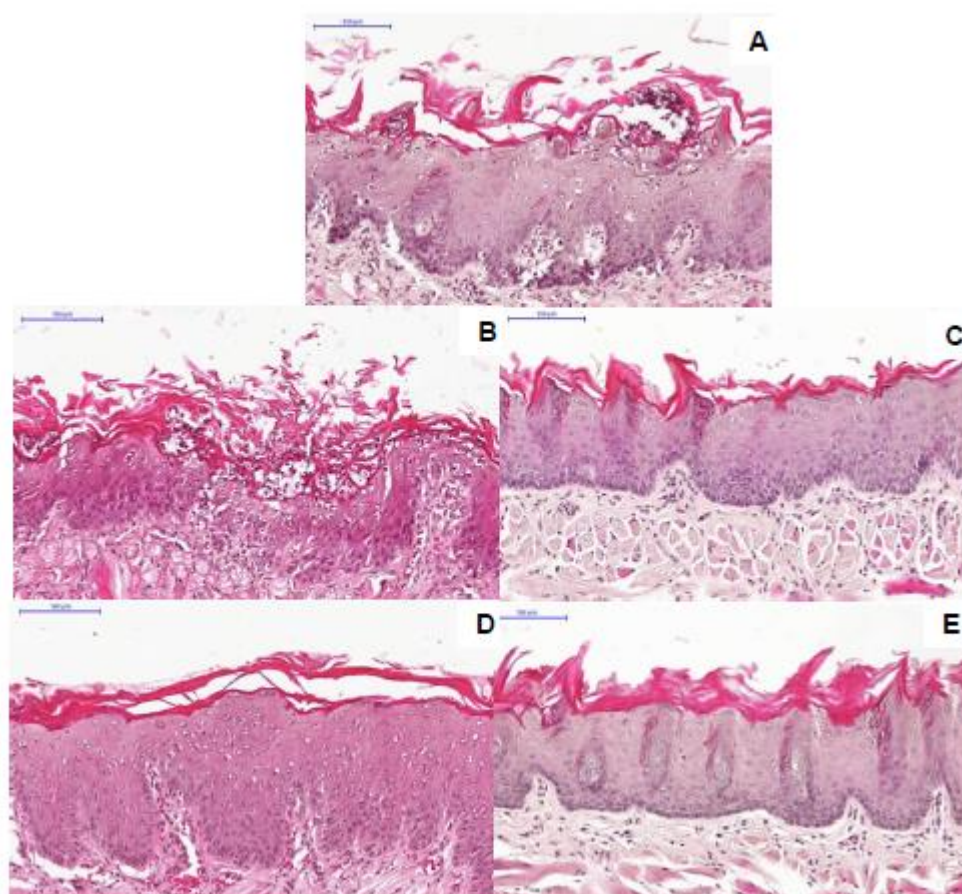


Figura 41

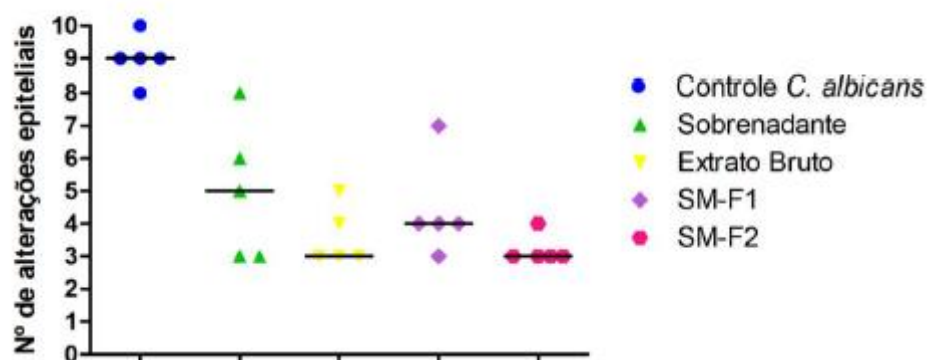


Figura 42

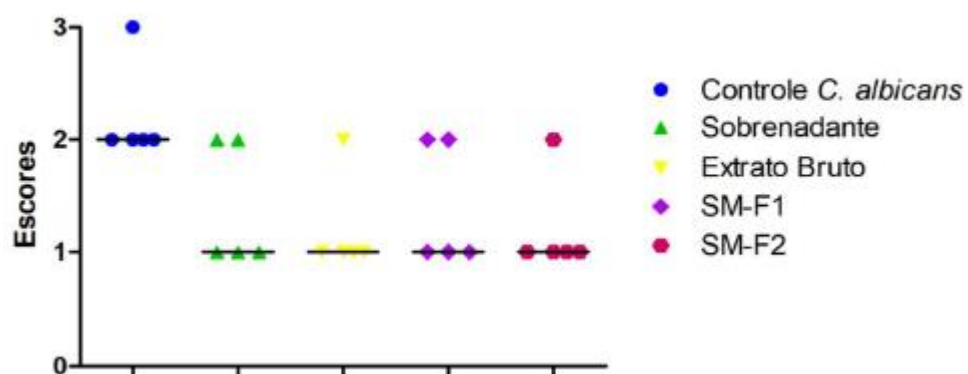


Figura 43

Resumo

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES DO SOBRENADANTE DE
S. MUTANS E USO DO EXTRATO E FRAÇÕES DO SOBRENADANTE DE S.
MUTANS COMO ANTIFÚNGICO**

A presente invenção refere-se a um método de obtenção de extrato bruto e frações de sobrenadante da cultura de *S. mutans* com atividade inibitória sobre *C. albicans*.

Dito método revelou ser eficaz na extração, fracionamento e identificação das substâncias produzidas por *S. mutans*. Em adição, ditos extrato e frações revelaram atividade antifúngica sobre *C. albicans* e eficácia no tratamento da candidose.