



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

LUCIANA RUANO DE OLIVEIRA FUGISAKI

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR
Streptococcus mutans* SOBRE *Candida albicans

2019

LUCIANA RUANO DE OLIVEIRA FUGISAKI

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR
Streptococcus mutans SOBRE *Candida albicans***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Fugisaki, Luciana Ruano de Oliveira

Atividade antifúngica de metabólitos produzidos por *Streptococcus mutans* sobre *Candida albicans*. / Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
97 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. *Streptococcus mutans* *Candida albicans* Bioprospecção . I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Dulce Helena Siqueira Silva

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Química

Campus de Araraquara

Profa. Dra. Monica Ghislaine Oliveira Alves

Universidade Mogi das Cruzes

Faculdade de Odontologia

Campus de Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 14 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

À Deus, por ter me concedido a vida, uma família tão especial e por ser luz guiando o meu caminho.

Aos meus queridos pais, Maria Aparecida Ruano de Oliveira e José Adelino de Oliveira, por todo amor, apoio e por me fornecerem a base, o alicerce da vida que é a família. Obrigada por moldarem o ser que hoje sou e por serem minha fortaleza.

Aos meus queridos irmãos, José Adelino de Oliveira Filho, Silvia Ruano de Oliveira (minha irmã gêmea, minha metadinha) e Marilice Ruano de Oliveira, mais do que irmãos, amigos de todas as horas, que apesar da distância física, nos mantemos sempre unidos. Minha sincera declaração de amor e admiração por cada um de vocês.

Ao meu marido, meu amor Eric Yudi Matsuda Fugisaki, sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida, me dando apoio, carinho e amor.

Ao meu filho Kenzo, meu novo amor. Você foi muito planejado e, agora em meu ventre, participa desta etapa tão importante e desejada por mim: minha defesa de doutorado.

A toda minha família, pelo amor, carinho, apoio e alegria em diversos momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por me dar força para vencer todos os obstáculos e dificuldades, me guiando e iluminando ao longo de toda minha vida. Por todas as oportunidades que Ele colocou durante toda a minha vida, e principalmente a oportunidade de estudar e colocar em meu caminho “sinais do Seu amor” em forma das pessoas que cruzaram o meu caminho e contribuíram para mais essa realização.

Aos meus pais, Maria Aparecida Ruano de Oliveira e José Adelino de Oliveira, pelo exemplo de vida sempre demonstrado, vindos de uma vida muito humilde, mas que sempre lutaram e enfrentaram todas as dificuldades com muito esforço, trabalho, paciência, coragem, fé e amor, edificaram suas (nossas) vidas. Sempre dizendo que eles haviam construído o primeiro degrau da escada, e que nós deveríamos continuar construindo os próximos e não voltar para o anterior e passar por tudo o que haviam passado até chegarem ali. Pelos valores inculcados, princípios éticos e morais dos quais nunca me afastei. Por incentivarem a mim e meus irmãos a estudar, dizendo que podem nos tirar tudo, mas o estudo ninguém nos tira e é o que nos levará a seguir um caminho melhor e abrir oportunidades. Pela motivação, compreensão e força nos momentos de desânimo e dificuldades longe de casa e de minhas raízes, sempre me incentivando a continuar lutando e tendo fé. Por sempre acreditarem e me fazerem acreditar que sou capaz. Pelo amor incondicional. Devo tudo o que sou e conquistei à vocês. Meu amor e eterno agradecimento, meus maiores exemplos!

Ao meu amor Eric Yudi Matsuda Fugisaki, a quem não só dedico como também agradeço por sempre acreditar na minha capacidade e me incentivar a não desistir dos meus sonhos. Por toda paciência e ajuda em tudo o que eu precisei em mais esta jornada. Por tudo o que você me proporciona que vai além de tudo o que sonhei, e por me dar o melhor presente, nosso primeiro filho que está a caminho. Você me inspira e me faz querer ser uma pessoa melhor a cada

dia. Meu amor e admiração por você.

À minha querida orientadora, Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, mais que uma orientadora, exemplo de pessoa e de profissional. Obrigada por depositar tanta confiança em mim e por ter me proporcionado um rico crescimento ao longo desses anos. Por não medir esforços para ajudar seus alunos, mesmo na correria do seu dia a dia. Pela paciência, dedicação, amizade e pelas oportunidades proporcionadas. Meu eterno agradecimento e admiração por você!

À Profa. Adj. Dulce Helena Siqueira Silva pela parceria extremamente enriquecedora, que nos proporcionou avançar nesta linha de pesquisa. Muito obrigada por todo o suporte necessário para a execução deste trabalho, nos permitindo desenvolver parte desse estudo no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Foi fundamental e muito enriquecedor. Meu eterno agradecimento.

À Dra. Rebeca Previante Medina, que se tornou uma amiga muito especial. Por todo o suporte no Laboratório de Química. Obrigada por nos receber, compartilhar tantos ensinamentos, por tanto trabalho e responsabilidade nessa pesquisa, que com certeza deu mais brilho e qualidade para esse estudo. Pela amizade, apoio, pelo ombro amigo e pelos momentos compartilhados. Minha gratidão e admiração por você, excelente profissional e pessoa, que muito me inspirou.

À querida amiga e parceira de trabalho Jéssica Diane dos Santos, por toda ajuda desde o início no laboratório. Obrigada pela amizade, sempre prestativa e disponível nos momentos de dificuldade e dúvidas. Por todo trabalho, muitas vezes árduo e cansativo até tarde da noite, muitos aos finais de semana, que antecederiam nossas viagens à Araraquara, mas que se tornavam leves diante da leveza que foi trabalhar com você. Obrigada pelo ombro amigo e pelos momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, por todo o convívio durante a realização das disciplinas, pelo apoio e ensinamentos transmitidos durante os três anos do doutorado, dando condições para a conclusão desta importante etapa. Em especial, à Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos e Prof. Adj. Mauro Pedrine Santamaria por todo apoio, ombro amigo e incentivo durante os momentos de dúvida em relação a fazer o doutorado, enquanto trabalhava nesta instituição.

À Profa. Dra. Liliana Scorzoni que se tornou uma amiga especial, e que de maneira tão especial trata com igualdade, ajudando a todos. Obrigada pelo auxílio durante a realização deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos e também pela amizade e apoio sempre demonstrados. Uma pessoa que agrega muito conhecimento, humildade, alto astral que inspira e cativa a todos.

À Dra. Patrícia Pimentel de Barros, por todo auxílio nos experimentos de Biologia Molecular. Obrigada pela confiança, disposição em ajudar e pelos valiosos ensinamentos.

A minha primeira aluna de iniciação científica, Mariana de Sá Alves, a qual foi também minha primeira co-orientação de trabalho de conclusão de curso. Obrigada pela ajuda e amizade. Fiquei muito feliz com esse desafio, nessa difícil missão de orientar e ensinar.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, que se tornaram especiais ao longo dessa jornada, Ana Carolina Chipoletti, Rodnei Dennis Rossoni, Felipe de Camargo Ribeiro, Janaína Araújo de Alvarenga, Livia Mara Figueiredo, Marisol dos Santos Velloso, Rafaella Braga, Fernanda Freire, Máira Terra Garcia, Isabela Abrão Venturini, Andressa Mayumi Namba, Thaís Cristine Pereira, Raquel Teles de Menezes e aos demais amigos de pós-graduação pela rica convivência que me fez crescer em vários aspectos. Vou sentir saudades da rotina do laboratório e de vocês.

À Dra. Thais Cachuté Paradella, pelo auxílio na microscopia eletrônica de varredura, permitindo a visualização dos nossos “amados” micro-organismos e pelas lindas fotos que ilustram este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro na concessão da Bolsa de Doutorado no período de 01/02/2016 a 18/02/2019, imprescindível para a realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das Bolsas de Iniciação Científica e Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Mariana de Sá Alves, a qual orientei durante esta jornada (processo 2016/05226-5).

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG), pelos auxílios financeiros contemplados em editais do Programa de Apoio a Participação de Docente/Discente em Programas de Pós-graduação - mobilidade discente - MOBIU, os quais foram essenciais para a realização de parte deste projeto em

Araraquara. (Edital Nº 04/2016-PROPG, primeiro e segundo semestres de 2016; Edital Nº 12/2017, segundo semestre de 2017 e Edital Nº 12/2017, primeiro semestre de 2018).

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Domingos Gonçalves Pontes e Sérgio Giovanny Alves (já não mais no laboratório), cujo auxílio foi essencial para o andamento deste trabalho.

Aos funcionários Carlos Guedes e Michele Ramos dos Santos, por toda ajuda e paciência nos trâmites relativos à FAPESP.

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

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Sandra Mara Cordeiro e Carolina Lourenço Rei, sempre gentis e prontos a nos atender e esclarecer as dúvidas.

A todos os funcionários do ICT-UNESP, em especial à equipe da Seção Técnica de Triagem, Emergência e Documentação e Central de Esterilização pelos anos de convívio durante os quase três anos em que trabalhei com vocês. Obrigada pela amizade daqueles em que acreditavam no meu potencial e sempre me incentivaram a seguir meus sonhos: Penha Maria Damasio Gonzaga, Elizete Wenzel Moreira, Jorge Francisco, Evelyn Requena de Souza Gonçalves, Michele Faria Alves, Jane Caravalho Andrade, Fatima Aparecida Sampaio Araújo, Melissa Maria da Costa Moreira Melo, Marcia Rodolfo Domingues Santos, Naiara Tiradentes Bozzo e José Claudinei Salgado. Aos demais funcionários dos mais diversos setores, os quais sempre tiveram muito carinho comigo durante todos esses anos de UNESP: Renata de Campos Ricci, Leandro Flores Nogueira, Helena Watanabe, Carla Tavares, Ivan Oliveira Damasceno, Lucelia Auxiliadora

Honorato, Luciano Muller Lima, Marco Alfredo, Lilian Vilela, Fernanda Brito, enfim a todos meu muito obrigada. Sentirei saudades.

Aos amigos que São José dos Campos me apresentou, os quais acompanharam e torceram por minhas conquistas. Obrigada pelos momentos de descontração e amizade.

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

“Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.
Onde você vê um motivo pra se irritar,
alguém vê a tragédia total
e o outro vê uma prova para sua paciência.
Onde você vê a morte,
alguém vê o fim
e o outro vê o começo de uma nova etapa...
Onde você vê a fortuna,
alguém vê a riqueza material
e o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.
Onde você vê a teimosia,
alguém vê a ignorância,
um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.
E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.
Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Cepas de micro-organismos e condições de cultivo.....	23
3.2 Obtenção do extrato bruto e frações do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	23
3.2.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>S. mutans</i>	23
3.2.2 Preparo do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	24
3.2.3 Preparo do extrato bruto do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	24
3.2.4 Fracionamento do extrato bruto do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	27
3.3 Identificação das substâncias presentes no extrato bruto e frações obtidas do sobrenadante da cultura de <i>S. mutans</i>	29
3.4 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a filamentação de <i>C. albicans</i> , analisados por Microscopia Óptica.....	31
3.4.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>C. albicans</i>	31
3.4.2 Ensaio de filamentação de <i>C. albicans</i>	31
3.5 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a filamentação de <i>C. albicans</i> , analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	32
3.6 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a expressão de genes de virulência de <i>C. albicans</i>	33
3.6.1 Extração e quantificação de RNA total	33
3.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	34
3.6.3 <i>Primers</i> para PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	35
3.6.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	37

3.7 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	39
3.7.1 Formação dos Biofilmes	39
3.7.2 Análise dos biofilmes por quantificação do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)	40
3.7.3 Análise dos biofilmes de <i>C. albicans</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
3.8 Análise Estatística	41
3.9 RESULTADOS	41
3.9.1 Identificação das substâncias produzidas por <i>S. mutans</i>	41
3.9.2 Avaliação dos efeitos inibitórios do extrato bruto e frações de <i>S. mutans</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>, analisados por Microscopia Óptica	47
3.9.3 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e frações sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>, analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
3.9.4 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e SM-F2 sobre a expressão de genes de virulência de <i>C. albicans</i>	57
3.9.5 Avaliação dos efeitos inibitórios do extrato bruto e das frações SM-F1 e SM-F2 de <i>S. mutans</i> em biofilmes de <i>C. albicans</i>	59
4 DISCUSSÃO	64
5 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	88

Fugisaki LRO. Atividade antifúngica de metabólitos produzidos por *Streptococcus mutans* sobre *Candida albicans* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

A formação de biofilmes e produção de hifas por *Candida albicans* são importantes fatores de virulência, principalmente, para a aderência à mucosa e invasão tecidual. A busca por metabólitos secundários produzidos por *S. mutans* é de suma importância, pois poderá fornecer novas estratégias terapêuticas no combate às infecções por *Candida*, possibilitando o desenvolvimento de medicamentos capazes de inibir os mecanismos de patogenicidade das espécies desse gênero. Desse modo, o objetivo desse estudo foi obter o extrato bruto e frações a partir do sobrenadante da cultura de 4 h de *S. mutans* (UA159) e avaliar seus efeitos sobre os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans* (ATCC18804) por meio de estudos *in vitro*. Após o cultivo de *S. mutans*, o extrato bruto foi obtido via partição líquido-líquido com acetato de etila (3x) e posteriormente fracionado em coluna de sílica derivatizada C-18 eluída com gradiente MeOH:H₂O, fornecendo cinco frações (SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4 e SM-F5). A identificação das substâncias contidas no extrato bruto e frações foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), sendo encontradas as seguintes substâncias: ácido octanóico e uridina no extrato bruto, ácido propanóico, (3R)-3-Methyl-1,4-bis(trimethylsilyl)piperazine-2,5-dione, pirimidina, gulose e oleamida na SM-F1 e ácido nicotínico e triptofano na SM-F2. O extrato bruto e as frações foram submetidos aos ensaios de bioatividade sobre a formação de hifas de *C. albicans* e analisados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O extrato bruto e a fração SM-F2, que resultou em maior inibição das hifas, foram investigados na expressão de genes de *C. albicans* envolvidos no mecanismo de filamentação (*CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1*) por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Além disso, o potencial de inibição do extrato bruto, frações SM-F1 e SM-F2 foi avaliado sobre a formação de biofilmes de *C. albicans*, analisados pela quantificação de células viáveis (UFC/mL) e MEV. Os resultados demonstraram inibição significativa na formação de hifas de *C. albicans* pelo extrato bruto e principalmente, pela SM-F2, com alterações significativas na expressão de todos os genes analisados. O extrato bruto e SM-F2 regularam negativamente a expressão dos genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1* e *UME6*, em contrapartida, regularam positivamente a expressão do gene *YWP1*, envolvido no mecanismo de dispersão das leveduras. Nas análises de UFC/mL, os resultados demonstraram redução nas contagens de *C. albicans* nos biofilmes formados quando em contato com o extrato bruto, frações SM-F1 e SM-F2 em todas as concentrações testadas, sendo que o extrato bruto reduziu totalmente as células de *C. albicans* na concentração 15 mg/mL. Os resultados do nosso estudo demonstraram que o extrato bruto e frações de *S. mutans* apresentaram efeitos inibitórios sobre importantes mecanismos de virulência de *C. albicans*, fornecendo evidências que *S. mutans* produz substâncias com ação antifúngica, tornando-o promissor na busca de novos compostos antimicrobianos para prevenção e tratamento das candidoses humanas.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*. Bioprospecção.

Fugisaki LRO. Antifungal activity of metabolites produced by Streptococcus mutans on Candida albicans [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

The biofilm formation and hyphae production by Candida albicans are important virulence factors, mainly for mucosal adhesion and tissue invasion. The search for secondary metabolites produced by S. mutans is of great importance, since it may provide new therapeutic strategies against Candida infections, enabling the development of drugs that inhibit the mechanisms of pathogenicity of the species of this genus. Thus, the objective of this study was to obtain the crude extract and fractions from the supernatant of the 4 h culture of S. mutans (UA159) and evaluate their effects on the mechanisms of pathogenicity of C. albicans (ATCC18804) through in vitro studies. After culture of S. mutans, the crude extract was obtained via liquid-liquid partition with ethyl acetate (3x) and then fractionated on a C-18 derivatized silica column eluted with MeOH:H₂O gradient, providing five fractions (SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4 and SM-F5). The identification of the substances contained in the crude extract and fractions was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The following substances were found: octanoic acid and uridine in crude extract, propanoic acid, (3R) -3-methyl -1,4-bis (trimethylsilyl) piperazine-2,5-dione, pyrimidine, gulose and oleamide in SM-F1 and nicotinic acid and tryptophan in SM-F2. The crude extract and fractions were submitted to bioactivity assays on hyphae formation by C. albicans and analyzed by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The crude extract and SM-F2 fraction, which resulted in highest inhibition of hyphae, were investigated in the expression of C. albicans genes involved in the filamentation mechanism (CPH1, EFG1, HWP1, UME6 and YWP1) by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). In addition, the potential of inhibition of the crude extract, SM-F1 and SM-F2 fractions in biofilms of C. albicans were evaluated by the quantification of viable cells (CFU/mL) and SEM. The data obtained were statistically analyzed by Graph Pad Prism 5.0, with a significance level of 5%. The results demonstrated a significant inhibition on C. albicans hyphae formation by the crude extract and mainly by SM-F2, with significant alterations in the expression of all genes analyzed. The crude extract and SM-F2 negatively regulated the expression of the CPH1, EFG1, HWP1 and UME6 genes, in contrast, positively regulated the expression of the YWP1 gene, involved in the mechanism of yeast dispersion. In the CFU/mL analyzes, the results showed a reduction in the counts of C. albicans in the biofilms formed when in contact with the crude extract, SM-F1 and SM-F2 fractions in all tested concentrations and the crude extract totally reduced C. albicans cells at 15 mg/mL concentration. The results of our study demonstrated that the crude extract and fractions of S. mutans presented inhibitory effects on important mechanisms of virulence of C. albicans, providing evidence that S. mutans produces substances with antifungal action, making it promising in the search for new compounds antimicrobials for the prevention and treatment of human candidoses.

Keywords: Streptococcus mutans. Candida albicans. Bioprospecting.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que normalmente encontram-se organizadas em biofilmes (Jarosz et al., 2009). Os biofilmes consistem em comunidades estruturadas de células microbianas, as quais estão aderidas às superfícies de organismos vivos e/ou objetos inanimados (Jiang et al., 2015) e embebidas em uma matriz extracelular tridimensional. Essa matriz proporciona um esqueleto essencial para o desenvolvimento do biofilme, promovendo adesão e coesão microbiana à superfície (Koo, 2013).

Streptococcus mutans é um importante patógeno oral que está presente na maioria da população mundial (Becker et al., 2002; Mitchell, 2003). Um dos principais fatores de virulência desse micro-organismo consiste em sua capacidade de formar biofilme na superfície do dente (Zhang et al., 2009), representando a primeira e principal etapa no desenvolvimento da cárie dentária (Assaf, 2015).

Nos biofilmes, a comunidade bacteriana controla diversos processos fisiológicos através de um mecanismo chamado *quorum sensing* (QS) (Syvitski et al., 2007; Zhang et al., 2009), no qual as bactérias utilizam estratégias de comunicação intercelular a fim de coordenar o comportamento coletivo. Assim, pequenas moléculas, denominadas auto-indutores, são sintetizadas pelas bactérias, secretadas no ambiente extracelular e quando presentes em quantidade suficiente coordenam a transcrição de diversos genes, os quais regulam os fatores de virulência, a síntese de moléculas antimicrobianas e a formação do biofilme. A concentração dessas moléculas aumenta proporcionalmente ao aumento da densidade celular, maximizando, portanto, a ligação dessas moléculas às proteínas reguladoras transcricionais (Stead et al., 1996; Van Delden, Iglewski, 1998; Williams, 2003; Monzon et al., 2016).

É sabido que o mecanismo de QS em *S. mutans* é responsável por regular inúmeras atividades fisiológicas como competência genética, produção de bacteriocinas, respostas ao estresse e formação do biofilme (Zhang et al., 2009). A capacidade das bactérias em utilizar mecanismos de QS na comunicação umas com as outras e no seu funcionamento como um grupo, proporciona benefícios

significativos durante a colonização do hospedeiro, auxiliando na defesa contra competidores e favorecendo sua adaptação em ambientes hostis (Syvitski et al., 2007). Foi demonstrado que para manter seu nicho, *S. mutans* inibe outras espécies microbianas através de competição, produzindo um peptídeo regulador chamado mutacina (Kreth et al., 2006). Estudos genéticos com diferentes isolados de *S. mutans* mostraram uma enorme diversidade de genes relacionados com a comunicação interespecies (Bekal-Si Ali et al., 2002; Klein et al., 2006) e produção de mutacina (Kamiya et al., 2008).

A elucidação dos mecanismos de interação entre 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). Além disso, estudos envolvendo a obtenção de novos metabólitos provenientes de extratos microbianos vêm sendo cada vez mais estudados, uma vez que bactérias e fungos produzem uma gama de moléculas bioativas quimicamente relevantes no ambiente extracelular, sendo alvos de estudo devido a seus impactos diretos em outros micro-organismos, bem como no hospedeiro (Ström et al., 2002; Shekh, Roy, 2012; Atiphasaworn et al., 2017; Jeong et al., 2017). Alguns exemplos de moléculas originalmente isoladas de micro-organismos e com relevância clínica são nistatina, epotilona B, ciclosporina e rifampicina (Martins et al., 2012; Shaw, 1989; Starks et al., 2003; Vézina et al., 1975).

Interações entre bactérias e fungos são comuns em humanos e podem influenciar a transição entre estado de saúde e doença, dentro de um nicho específico no hospedeiro. *Candida albicans* é o patógeno fúngico oportunista mais comumente encontrado nas superfícies mucosas dos seres humanos, podendo causar infecções severas e recorrentes na mucosa, como também infecções sistêmicas fatais (Mayer et al., 2013; Tsui et al., 2016; Hwang et al., 2017). Tal capacidade está associada à formação de biofilme, frequentemente envolvendo interações com bactérias que podem aumentar o seu acúmulo e virulência (Falsetta et al., 2014; Hwang et al., 2017). Além disso, a patogenicidade de *C. albicans* é favorecida pela produção de um arsenal de fatores de virulência, sendo a capacidade em alterar sua morfologia de levedura para hifa fundamental na causa

de doenças (Nobile, Johnson, 2015; Gulati, Nobile, 2016; Tsui et al., 2016). Estudos demonstram que mutantes com deficiência na formação de hifas são menos virulentos (Loeb et al., 1999; Whiteway et al., 2004), pois as formas filamentosas possuem maior capacidade de aderir, penetrar e colonizar os órgãos e tecidos do hospedeiro, enquanto a forma leveduriforme desempenha importante papel na disseminação através da corrente sanguínea (Loeb et al., 1999; Hazan et al., 2002; Altenburg et al., 2008). Todas as morfologias desempenham importantes funções na formação do biofilme de *C. albicans*, que são comunidades fúngicas clinicamente relevantes difíceis de tratar, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Ramage et al., 2005; Altenburg et al., 2008; Li, Nielsen, 2017).

Essa levedura comensal é comumente encontrada na cavidade bucal dos seres humanos, sendo isolada em aproximadamente 62% dos indivíduos saudáveis. Neste nicho, sabe-se que *C. albicans* co-adere a estreptococos comensais (estreptococos do grupo viridans), os quais promovem o transporte fúngico, conduzindo à infecção da mucosa oral (Xu et al., 2014; Hwang et al., 2017). Desse modo, vários estudos clínicos relatam que *C. albicans* é frequentemente encontrada em biofilmes contendo alto número de *S. mutans*, formados nas superfícies dentárias de crianças com cárie precoce da infância (de Carvalho et al., 2006; Xiao et al., 2016; Hwang et al., 2017).

Uma variedade de estímulos ambientais do hospedeiro é conhecida por induzir a transição levedura-hifa, tais como temperatura (37°C), soro, hormônios e pH (Brown, 2002; Childers, Kadosh, 2015). Estas condições ativam rotas transcricionais, resultando na expressão de genes específicos das hifas (Biswas et al., 2007; Childers, Kadosh, 2015). Após a fase de adesão, segue-se a maturação do biofilme, conferida pela expressão do gene *EFG1*, o qual é um regulador transcricional envolvido na morfogênese, responsável por modular a diferenciação das hifas e estar envolvido na maturação do biofilme (Blankenship, Mitchell, 2006; Nobile et al., 2008; Barros et al., 2018a). Outros dois importantes reguladores transcricionais específicos dessas estruturas são os genes *CPH1* e *UME6*. A expressão deste último consiste em um fator imprescindível para que ocorra a extensão das hifas (Banerjee et al., 2008; Childers, Kadosh, 2015). O gene *HWP1* codifica a principal proteína de parede celular das hifas (proteína 1), a qual

desempenha importante papel de adesina, promovendo a ligação de *Candida* às células epiteliais do hospedeiro, bem como interação com moléculas bacterianas, contribuindo para uma colonização eficiente dentro de uma comunidade polimicrobiana (Tsuchimori et al., 2000; Orsi et al., 2014). Foi demonstrado que cepas mutantes para este gene foram avirulentas quando comparadas a cepa controle selvagem (Tsuchimori et al., 2000; Sundstrom et al., 2002; Orsi et al., 2014). Já o gene *YWP1* codifica uma glicoproteína da parede celular de *C. albicans* presente nas leveduras e ausente nas hifas. Porém, a expressão desse gene confere uma capacidade anti-adesiva à parede, com possível ação na dispersão das leveduras. Desse modo, leveduras que não possuem esse gene são mais adesivas e formam um biofilme mais espesso (Granger, 2012).

A interação entre bactérias e fungos em biofilmes mistos tem sido associada com a redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas por bactérias, pela liberação direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes. Outro mecanismo de interação entre bactérias e fungos é a modificação nas condições ambientais, como a mudança no pH, que pode influenciar a formação de hifas por *C. albicans*. Além destas interações antagônicas, interações mutuamente benéficas em biofilmes mistos também têm sido observadas, nas quais as diferentes espécies podem fornecer proteção uma para outra contra o sistema imunológico ou aos agentes antimicrobianos (Peleg et al., 2010). Gregoire (2011) demonstrou que a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* na presença de sacarose pode ser mediada pela glicosiltransferase, enzima sintetizada por *S. mutans* para formação dos glucanos, os quais possibilitam a aderência de *S. mutans* à superfície do esmalte dentário. Esses autores verificaram por microscopia de fluorescência que a glicosiltransferase produzida por *S. mutans* foi capaz de se aderir à superfície celular de *C. albicans* e formar glucanos. Desse modo, o glucano presente na superfície da levedura aumentou a capacidade de aderência entre *S. mutans* e *C. albicans*.

Pereira-Cenci et al. (2008) estudaram a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em biofilmes formados *in vitro* sobre diferentes substratos e verificaram que *S. mutans* suprimiu a formação de hifas por *C. albicans*. Jarosz et al. (2009) avaliaram a interação entre *S. mutans* e *C. albicans* em relação a produção de

moléculas do *quorum sensing* e verificaram que o sobrenadante da cultura de 4 h de *S. mutans* inibiu a formação de tubo germinativo de *C. albicans*, indicando que *S. mutans* produz moléculas durante os estágios iniciais de seu crescimento, capazes de atuar sobre a virulência fúngica. Joyner et al. (2010) atribuíram a capacidade inibitória sobre as hifas ao metabólito mutanobactin A. De acordo com esses autores, tal composto une-se a um grupo seletivo de outras duas biomoléculas produzidas por *S. mutans*, capazes de redirecionar o dimorfismo levedura-hifa de *C. albicans*, caracterizadas como peptídeo estimulador de competência (Jarosz et al., 2009) e ácido trans-2-decenóico (Vílchez et al., 2010), respectivamente. A formação das hifas parece ser um dos pontos críticos para formação de biofilme de *C. albicans*, pois estudos demonstraram que mutações nos genes relacionados com a formação dessas estruturas resultaram em graves defeitos na formação do biofilme (Nobile, Mitchell, 2005, 2006; Fuchs et al., 2010).

Outra biomolécula produzida por *S. mutans*, a mutacina 1140, mostrou-se promissora como droga antibacteriana (Hillman et al., 1998; Escano et al., 2014), apresentando amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas (Chen et al., 2013; Ghobrial et al., 2017; Ongey et al., 2017; Premnath et al., 2018).

Em estudo realizado por nosso grupo (Barbosa et al., 2016), foi demonstrado que o sobrenadante da cultura de *S. mutans* resultou em efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, interferindo na sua capacidade de filamentação e formação de biofilme. Tais autores demonstraram que a inoculação das células e do sobrenadante de *S. mutans* em *Galleria mellonella*, infectada por *C. albicans*, diminuiu o desenvolvimento da candidose experimental. Já a inoculação apenas do sobrenadante da cultura de *S. mutans* apresentou efeito inibitório sobre a formação de hifas nos tecidos de *G. mellonella*. Esses achados sugerem que *S. mutans* secretam subprodutos no meio de cultura com ação antifúngica.

O tratamento da candidose bucal tornou-se muito difícil devido ao surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais e à baixa disponibilidade de novos fármacos para as infecções fúngicas. Diante disso, 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). Sendo assim, são necessários esforços cujo foco seja encontrar novos agentes terapêuticos os quais sejam capazes de solucionar as infecções mediadas por *C. albicans*. Diante disso, investigações envolvendo agentes antifúngicos alternativos, especialmente os antivirulentos e antibiofilmes têm atraído considerável interesse de pesquisa.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antifúngico de metabólitos produzidos por *S. mutans* sobre os mecanismos de virulência de *C. albicans*.

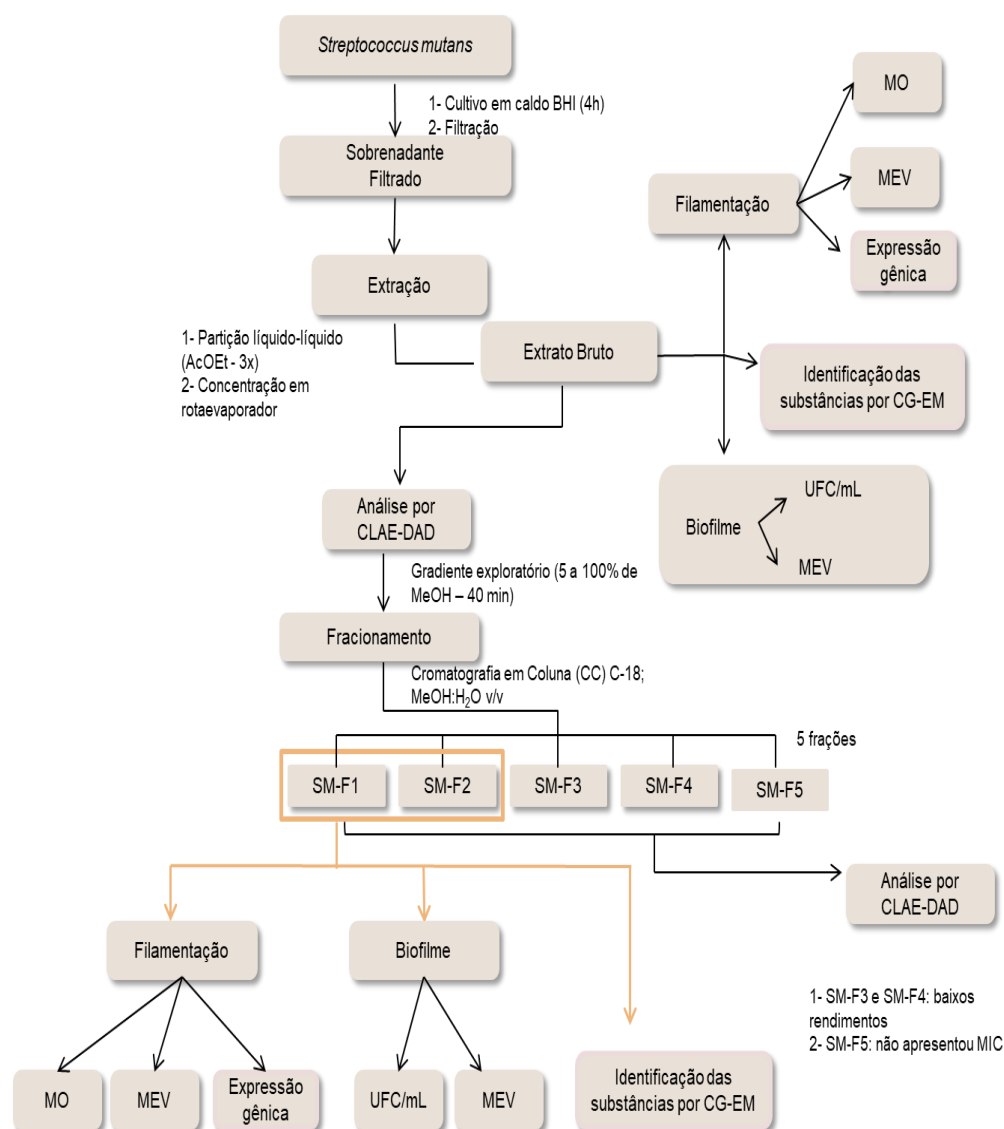
2.2 Objetivos específicos

- a) extrair, fracionar e identificar os compostos presentes no sobrenadante da cultura de *Streptococcus mutans*;
- b) avaliar o potencial antifúngico do extrato bruto e das frações obtidas sobre *C. albicans*, quanto à capacidade de filamentação e formação de biofilme *in vitro*;
- c) avaliar o perfil de expressão dos genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1* de *C. albicans*, após tratamento com extrato bruto e frações que foram mais ativos na inibição das hifas, por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas e os ensaios experimentais realizados neste estudo estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Delineamento do estudo e distribuição dos ensaios realizados



Legenda: MO: Microscopia Óptica. MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura. CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos. MeOH: Metanol. UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônias por mililitro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 Cepas de micro-organismos e condições de cultivo

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

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

3.2.1 Preparo da suspensão padronizada de *S. mutans*

Após reativação da cepa, *S. mutans* foi cultivado em caldo BHI (BHI, Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubado a 37°C, por 24 h, em condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após o período de crescimento, procedeu-se à centrifugação da cultura a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi ressuspenso em solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS), caracterizando a etapa de lavagem das células, e após, centrifugado novamente nas mesmas condições. Esse procedimento foi realizado novamente, e após o descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi ressuspenso em PBS. A concentração microbiana foi determinada espectrofotometricamente (B582, Micronal, São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda 398 nm e densidade óptica de 0,560, obtendo-se uma concentração de 10⁷ células/mL de *S. mutans*.

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

O preparo do sobrenadante de *S. mutans* foi realizado de acordo com Barbosa et al. (2016). Desse modo, após o preparo da suspensão padronizada de *S. mutans*, 1 mL dessa suspensão foi adicionada à um tubo falcon contendo 6 mL de caldo BHI. Este foi incubado a 37°C por 4 h em condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após este período, a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi filtrado em sistema de filtragem a vácuo em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro (Stericup® and Steritop® Filter Unit, Millipore, Massachusetts, EUA).

3.2.3 Preparo do extrato bruto do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Esta etapa do trabalho foi realizada no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), do Instituto de Química da Unesp, *campus* de Araraquara. O método de extração utilizado foi via partição líquido-líquido utilizando o solvente acetato de etila, de acordo com a metodologia padronizada pelo grupo.

Desse modo, o sobrenadante filtrado foi submetido à extração com acetato de etila (3 vezes) e após, o solvente orgânico foi removido sob vácuo em evaporador rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo (D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments) e refrigeração a uma temperatura inferior a 3°C (Marconi BTC-9090). Em seguida, os compostos retidos no frasco foram coletados com metanol, e depois disso, este solvente foi evaporado com auxílio de uma bomba por aproximadamente 16 h. Após, o extrato foi liofilizado por mais ou menos 14 h e pesado, obtendo-se o extrato bruto (Figura 2).

Neste primeiro processo de extração, foram obtidos os extratos brutos, em escala reduzida, de ambas as fases: um proveniente da fase aquosa (contendo o

caldo BHI) e outro proveniente da fase orgânica (contendo o solvente e possivelmente os compostos ativos extraídos por ele). Em seguida, ambos os extratos brutos (orgânico e aquoso) foram submetidos aos ensaios de bioatividade, a fim de verificar se permanecia com a capacidade inibitória sobre *C. albicans* e também, para avaliar se o método de extração utilizado foi eficiente. Uma vez verificada a atividade biológica apenas do extrato bruto orgânico, o extrato proveniente da fase aquosa passou a não ser mais utilizado e foi descartado nas demais extrações. Para a etapa de fracionamento, foi realizada a obtenção de extrato bruto em escala ampliada, visto a necessidade de utilizarmos aproximadamente 1 g do extrato para obter massa suficiente das frações.

O Quadro 1 apresenta os rendimentos em massa dos extratos brutos obtidos em todas as extrações.

Figura 2 – Esquema de obtenção do extrato bruto a partir do sobrenadante da cultura de *S. mutans*



Legenda: O sobrenadante foi submetido à extração com acetato de etila (3 vezes) **(A)**, em seguida o solvente orgânico **(B)** foi removido sob vácuo em evaporador rotatório da Buchi R-114 (banho de aquecimento B-480), sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo (D-91126 Schwabach da Heidolph Instruments) e refrigeração a uma temperatura inferior a 3°C (Marconi BTC-9090) **(C)**. Em seguida, os compostos que foram extraídos e ficaram retidos no balão foram coletados com metanol (MeOH) **(D)** e o solvente foi evaporado com auxílio de uma bomba **(E)**, “overnight”. O extrato foi liofilizado **(F)** e pesado, obtendo-se o extrato bruto **(G)**.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1 – Rendimentos dos extratos brutos do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

Volume de Sobrenadante (mL)	Massa do Extrato Bruto Orgânico (SM-EBO) (g)	Massa do Extrato Bruto Aquoso (SM-EBA) (g)
375	0,051	2
500	0,110	-
6400	1,474	-
6000	0,920	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

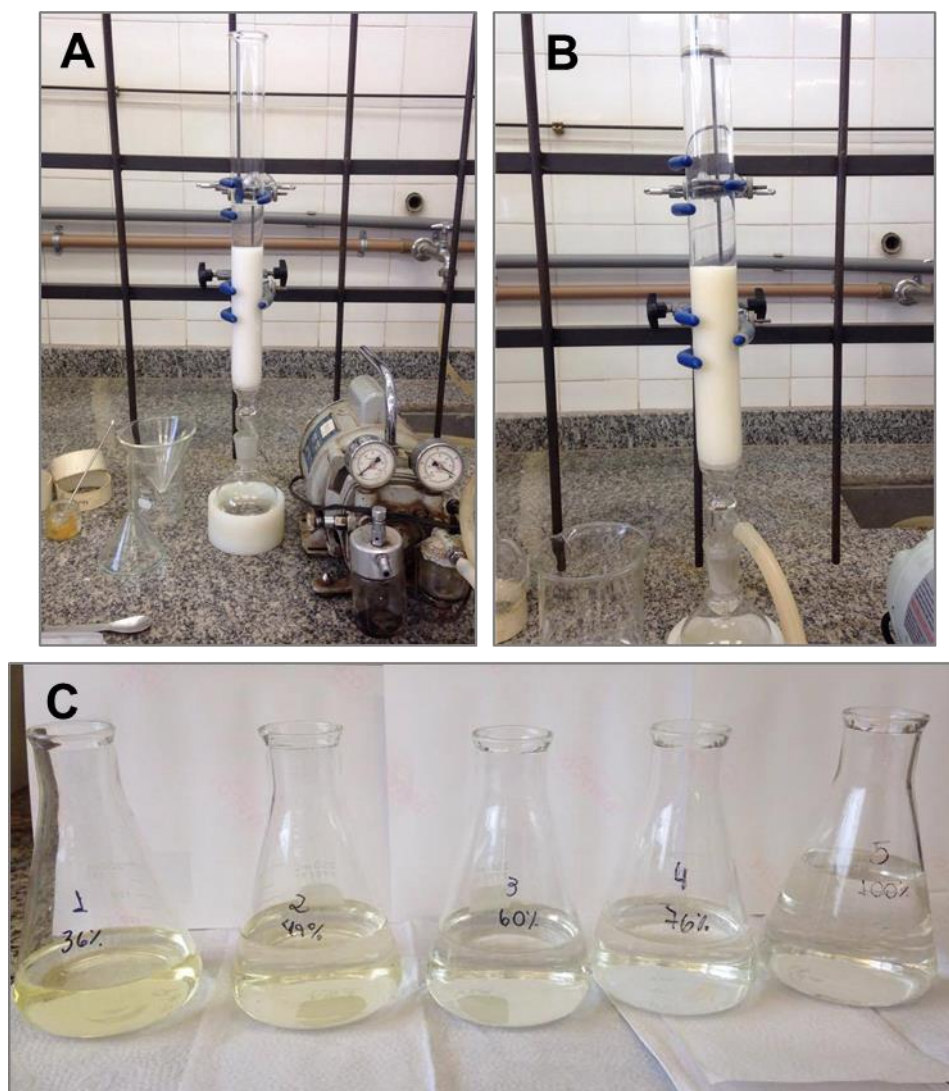
3.2.4 Fracionamento do extrato bruto do sobrenadante da cultura de *S. mutans*

A partir do perfil obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) do extrato bruto (SM-EB), optou-se por submetê-lo ao fracionamento em coluna de sílica derivatizada C-18 (150 g, Φ = 3,5 cm) utilizando diferentes soluções de MeOH:H₂O como eluente (Figura 3), cujas proporções foram determinadas a partir da análise do cromatograma do perfil, sendo obtidas 5 frações: SM-F1, SM-F2, SM-F3, SM-F4 e SM-F5 (Quadro 2).

Após a obtenção destas frações, foram realizadas análises para a determinação de seus perfis químicos por CLAE-DAD (APÊNDICE A), além de testes de bioatividade para seleção das frações a serem estudadas.

As frações SM-F3 e SM-F4 não foram utilizadas nos testes posteriores, pois não obtivemos quantidade suficiente para realização dos ensaios experimentais e a SM-F5 não apresentou atividade inibitória no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizado anteriormente por Santos (2018).

Figura 3 – Fracionamento do extrato bruto do sobrenadante da cultura de *S. mutans*



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

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

Frações	Proporção de MeOH:H ₂ O	Massa (mg) à partir de 1,474 g de extrato bruto	Massa (mg) à partir de 0,92 g de extrato bruto
Fração 1 (SM-F1)	36:64	969,3	927,6
Fração 2 (SM-F2)	49:51	210	281,8
Fração 3 (SM-F3)	60:40	22,7	30,7
Fração 4 (SM-F4)	76:24	6	4,8
Fração 5 (SM-F5)	100:0	397,2	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

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

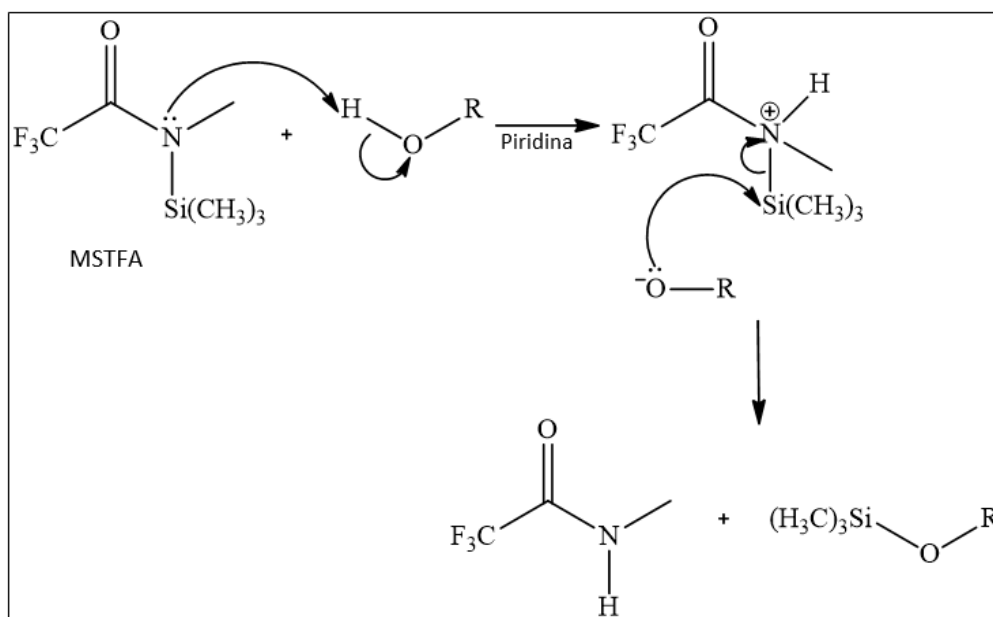
O extrato bruto (SM-EB), as frações SM-F1 e SM-F2, bem como o controle (apenas caldo BHI) foram analisados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM, Shimadzu, modelo GC-MS-QP2020) com auto injetor AOC-20i. A coluna utilizada para as análises foi Supelco RTX-5MS (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. As condições cromatográficas foram as seguintes:

- Temperatura do injetor: 260°C
- Modo de injeção: split
- Temperatura do detector: 260°C

- Vazão do gás de arraste (He): $1,0 \text{ mL min}^{-1}$
- Coluna: 80°C (3 min) $\xrightarrow{3^\circ\text{C/min}}$ 260°C (10 min).

O espectrômetro de massas utilizado nas análises de CG-EM é equipado com fonte de ionização por impacto eletrônico (EI), ajustada em 70 eV e uma faixa de massas de aquisição de m/z 35-700. Durante o preparo das amostras foi realizada uma etapa de derivatização (sililação), que consiste na substituição dos hidrogênios ativos presentes nos grupos $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}$ e $-\text{COOH}$ dos metabólitos por grupos trimetilsilil (TMS) (Figura 4), de forma a obter-se derivados com menor polaridade, maior volatilidade e estabilidade térmica, garantindo uma melhor resolução cromatográfica (Pellatti; Benvenuti, 2007). Sendo assim, 5 mg de SM-EB, 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 ($0,22 \mu\text{m}$) e posteriormente analisadas (Tomaz, 2011).

Figura 4 - Mecanismo para a reação de sililação (exemplificada para um álcool)



Fonte: Elaborado pelo autor

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

3.4.1 Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans*

C. albicans foi cultivada a 37°C por 24 h em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco, Detroit, USA) 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*.

3.4.2 Ensaio de filamentação de *C. albicans*

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.

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

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 detalhado no item 3.4. 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.

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

Foi utilizado o modelo de filamentação, descrito previamente no item 3.4.2, 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 de RNA.

3.6.1 Extração e quantificação de RNA total

O RNA total das leveduras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras coletadas anteriormente foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min e após esse período, 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adicionados, sendo homogeneizado por 15 min, incubado a temperatura ambiente por 3 min e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C (Eppendorf 5430R, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante (a fase aquosa contendo o RNA) foi transferido cuidadosamente para um tubo estéril, com o cuidado de não transferir nenhum precipitado sólido da interfase ou da fase orgânica rosa. Desse modo, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 500 µL de isopropanol 100% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após gentil homogeneização, a mistura

foi incubada a temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, o RNA foi coletado por centrifugação a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. O isopropanol foi removido e o *pellet* de RNA foi lavado com etanol 70% gelado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (preparado com água livre de RNase, tratada com dietilpirocarbonato - DEPC), seguido por centrifugação a 10.000 rpm por 5 min a 4°C. O etanol 70% foi removido e o RNA ressuspensão em 10 µL de RNA Storage Solution (Ambion, Carlsbad, CA, USA), sendo incubado em bloco de aquecimento a 55°C por 5 min e, posteriormente estocado a -80°C.

O RNA total extraído foi quantificado (ng/µL) em micro-espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com leituras nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA, aquele com relação $A_{260/280}$ entre 1,9 – 2,0, caracterizando RNA íntegro e de boa qualidade. O DNA foi removido com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante, no qual 1 U de DNase foi utilizada para cada 1000 ng de RNA. Desse modo, foram utilizados 1 µL de DNase, 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer e água livre de RNase (DEPC) suficiente para um volume final de 9 µL. A reação foi incubada a 25°C por 10 min, e em seguida, adicionado 1 µL de EDTA pH 8.0 (25 mM), sendo incubado a 65°C por 10 min.

3.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para cada reação de síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado 720 ng de RNA total utilizando o Kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A cada reação foram adicionados: 1 µL de random hexamers (50 ng/µL), 1 µL de dNTP mix (10 mM) e 1 µL de água livre de RNase. As reações foram incubadas em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 5 min a 65°C, sendo em seguida colocado no gelo por 1 min. Após, foram adicionados: 4 µL de 5X SuperScript IV RT buffer, 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase out Recombinant

RNase Inhibitor (40 U/ μ L) e 1 μ L de Superscript IV Reverse transcriptase (200 U/ μ L). As reações foram incubadas por 10 min a 23°C, 10 min a 50 – 55 °C e 10 min a 80 °C. 1 μ L de RNase H (2 U/ μ L) foi adicionado em seguida e incubado por 20 min a 37°C. O cDNA foi armazenado a - 20 °C.

3.6.3 *Primers* para PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Os *primers* e suas sequências para os genes alvos e referência endógena de *C. albicans* utilizados nesse trabalho estão listados no Quadro 3, sendo as sequências nucleotídicas confirmadas no site do NCBI/Gene Bank e suas especificidades confirmadas por Barros et al. (2016).

Os genes *RPP2B*, *ACT1* e *PMA1* foram testados como genes de referência ou controle endógenos, também denominados genes normalizadores (*housekeeping*). Estes genes não apresentam alterações em seus níveis de expressão em todas as amostras e tratamentos aplicados, sendo utilizados para normalizar os genes alvos na quantificação relativa de expressão gênica. A análise para seleção do controle endógeno foi realizada no website <http://www.leonxie.com>, o qual utiliza quatro métodos diferentes: Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm. Quanto menor valor no ranking, melhor a estabilidade do gene para normalização dos dados obtidos na quantificação relativa da expressão gênica. Desse modo, o gene de referência recomendado para ser utilizado na quantificação relativa foi o *PMA1* (Figura 5).

Figura 5 - Seleção do gene de referência (*RPP2B*, *ACT1* e *PMA1*) mais adequado para a quantificação relativa



Legenda: Gráfico obtido através do site <http://www.leonxie.com>.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 3 – Sequência dos *primers* utilizados para RT-qPCR

Gene	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>CPH1</i>	F ACGCAGCCACAAGCTCTACT R GTTGTGTGTGGAGGTTGCAC	119	Sherry et al. (2014)
<i>EFG1</i>	F CAGTATGGTCAGTATAATGCT R TTGTTGTTGCTGTTGGTATGGATATGATGATG	222	Hnisz et al. (2012)
<i>HWP1</i>	F GAAACCTCACCAATTGCTCCAG R GTAGAGACGACAGCACTAGATTCC	92	Hnisz et al. (2012)
<i>UME6</i>	F TCATTCAATCCTACTCGTCCACC R CCAGATCCAGTAGCAGTGCTG	133	Hnisz et al. (2012)
<i>YWP1</i>	F ACACCGGAAAATACCGTTGC R ATGGCAGCTTTACCAGAACC	116	Granger et al. (2012)
<i>RPP2B*</i>	F TGCTTACTTATTGTTAGTTCAAGGTGGGTA R CAACACCAACGGATTCCAATAAA	83	Nailis et al. (2006)
<i>ACT1*</i>	F GAAGCCCAATCCAAAAGA R CTTCTGGAGCAACTCTCAATTC	130	Nailis et al. (2006)
<i>PMA1*</i>	F TTGCTTATGATAATGCTCCATACGA R TACCCCAACAATCTTGGCAAGT	66	Nailis et al. (2006)

Legenda: *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6*, *YWP1*, *RPP2B*, *ACT1*, *PMA1*. F: Forward *primer*. R: Reverse *primer*. pb: pares de base. *Genes de referência.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante. As reações foram conduzidas em termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). As reações de PCR foram realizadas em triplicatas, constituindo-se de 10 µL de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG, 1 µL de ROX Reference Dye (1:10), 0,1 µL (10 µM) de

Forward *primer*, 0,1 µL (10 µM) de Reverse *primer*, 4,4 µL de cDNA (diluído 1:4), sendo completado com água livre de RNase para um volume final de 20 µL. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram 50°C por 2 min; 95°C por 2 min; seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, sendo os dados coletados na última etapa. Após o término da quantificação relativa, a fim de verificar a formação de dímeros de *primers*, amplificações inespecíficas e contaminações, realizou-se a curva de dissociação. Os dados obtidos foram analisados no software do equipamento de PCR em tempo real.

Durante a fase exponencial de amplificação é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar ou *threshold* e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido *cycle threshold* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação. Este valor é a base para a quantificação baseada em PCR quantitativo (Marcelino, 2006).

Os valores médios de Ct dos genes alvos (*CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1*) e da referência endógena (normalizador) *PMA1* foram calculados.

Posteriormente, através da subtração de Ct do gene alvo com o Ct do normalizador foi obtido o ΔCt . Este valor de ΔCt do gene alvo é subtraído do valor de ΔCt da amostra controle (calibrador – controle não tratado), resultando num valor de $\Delta\Delta Ct$. O nível de expressão gênica (RQ) foi calculado aplicando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001), com base nas eficiências obtidas entre o gene alvo e normalizador.

O ensaio foi realizado em triplicata, com três repetições por grupo na placa, totalizando 9 pontos de coleta de dados para cada gene e tratamento.

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

3.7.1 Formação dos Biofilmes

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 no item 3.4.1. 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.

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 μ L) foi adicionado. Nesta etapa de troca do meio, foram adicionados 50 μ L do extrato bruto bruto ou 50 μ L das frações SM-F1 ou SM-F2, bem como 50 μ L 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.

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

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 ultra-sônico (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.

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

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 no item 3.7.1. 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.

3.8 Análise Estatística

Os escores obtidos na quantificação das hifas nos ensaios de filamentação foram analisados aplicando-se os testes Kruskal-Wallis e Dunn. Os dados da contagem de UFC/mL do biofilme de *C. albicans* e os dados de expressão gênica foram analisados pelo teste *t* de Student. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 e 7.0 (GraphPad Software, Inc., California, CA, EUA) com nível de significância de 5%.

3.9 RESULTADOS

3.9.1 Identificação das substâncias produzidas por *S. mutans*

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

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

observadas para alguns picos do controle, como os picos em $T_R = 29.805, 42.460, 50.795, 52.832, 53.708, 56.405, 58.630$ min.

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

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

Tabela 1 - Identificação das substâncias presentes no controle por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

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

Legenda: TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com os demais grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Identificação das substâncias presentes no extrato bruto por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

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

Legenda: TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Identificação das substâncias presentes na fração SM-F1 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

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

Legenda: TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Identificação das substâncias presentes na fração SM-F2 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

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

Legenda: TMS - grupo trimetilsilil. *Substâncias destacadas em negrito são aquelas diferentes quando comparadas com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

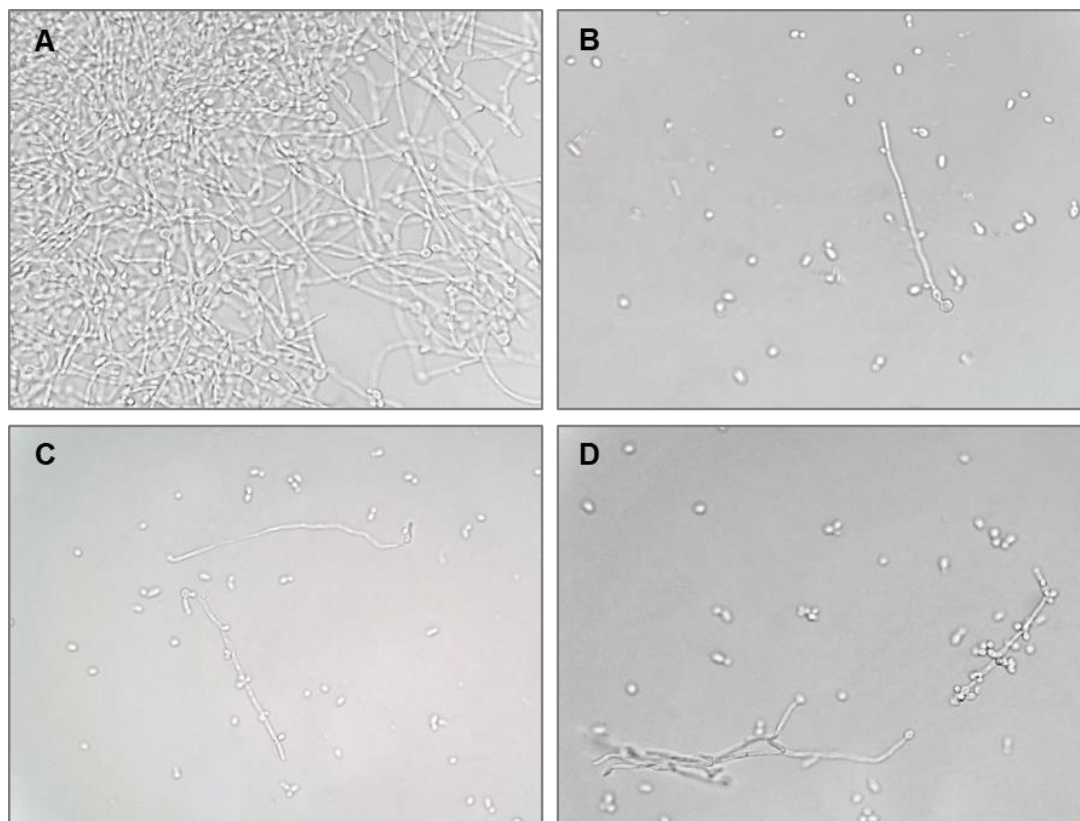
3.9.2 Avaliação dos efeitos inibitórios do extrato bruto e frações de *S. mutans* sobre a filamentação de *C. albicans*, analisados por Microscopia Óptica

Primeiramente, foi realizado o ensaio de filamentação 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, adicionamos 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 (imagens não mostradas). Porém, nas concentrações 5, 10 e 15 mg/mL podemos observar que houve redução na filamentação de *C. albicans* (Figura 6), 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 7).

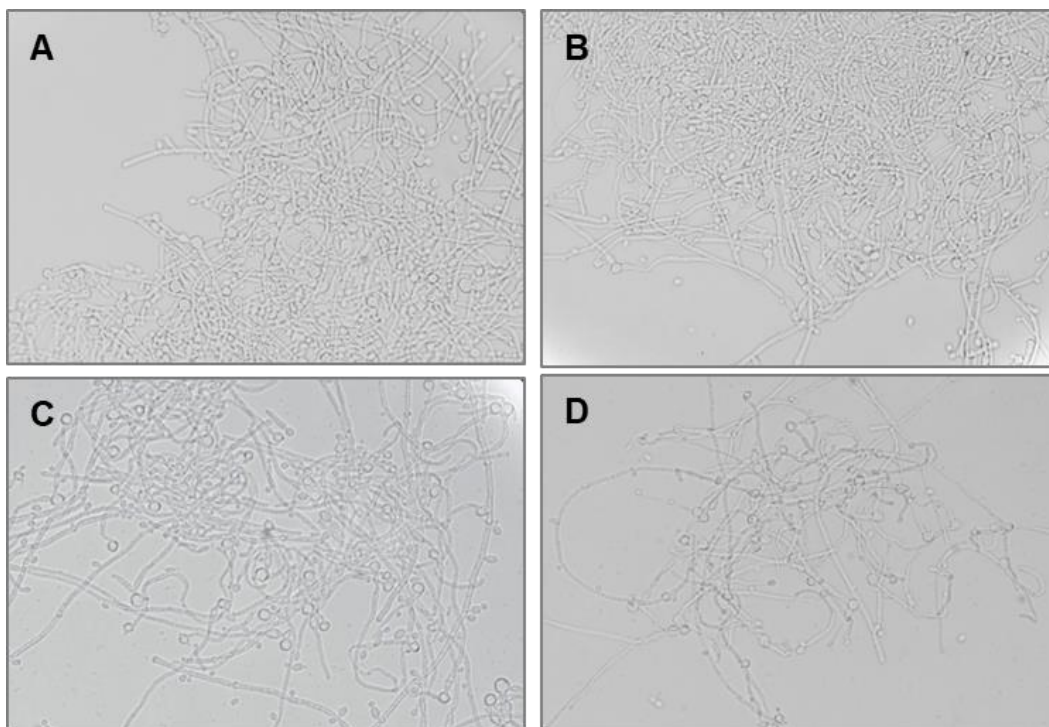
Desse modo, analisando esses dados, podemos demonstrar que o extrato bruto foi capaz de inibir a formação de hifas de *C. albicans*.

Figura 6 - Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans*



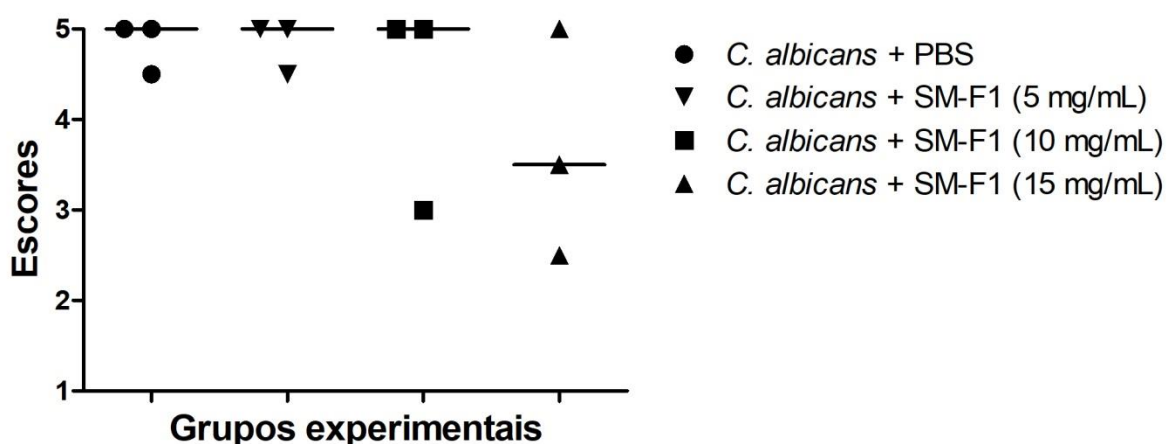
Legenda: **A)** Grupo controle formado por *C. albicans* + PBS: podemos observar a presença de inúmeras hifas; **B)** *C. albicans* tratada com extrato bruto (5 mg/mL); **C)** *C. albicans* tratada com extrato bruto (10 mg/mL); **D)** *C. albicans* tratada com extrato bruto (15 mg/mL); Verificamos nas imagens **B**, **C** e **D** que o extrato bruto reduziu a formação de hifas. Aumento original: 400x
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans* quando em contato com a fração SM-F1



Legenda: **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
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Quantificação das hifas no ensaio da filamentação de *C. albicans* *in vitro*

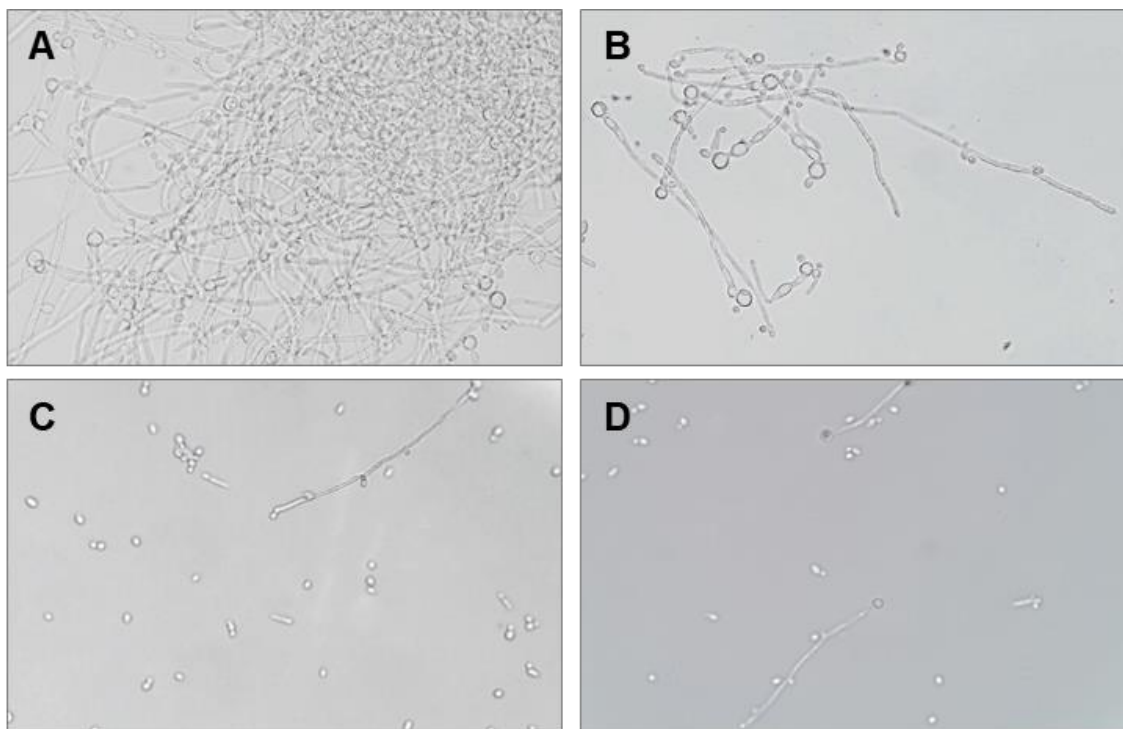


Legenda: Gráfico representando a mediana dos escores obtidos pela determinação da quantidade de hifas de *C. albicans* nos seguintes grupos: *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + SM-F1 (5 mg/mL), *C. albicans* + SM-F1 (10 mg/mL) e *C. albicans* + SM-F1 (15 mg/mL). Os escores foram atribuídos 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, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

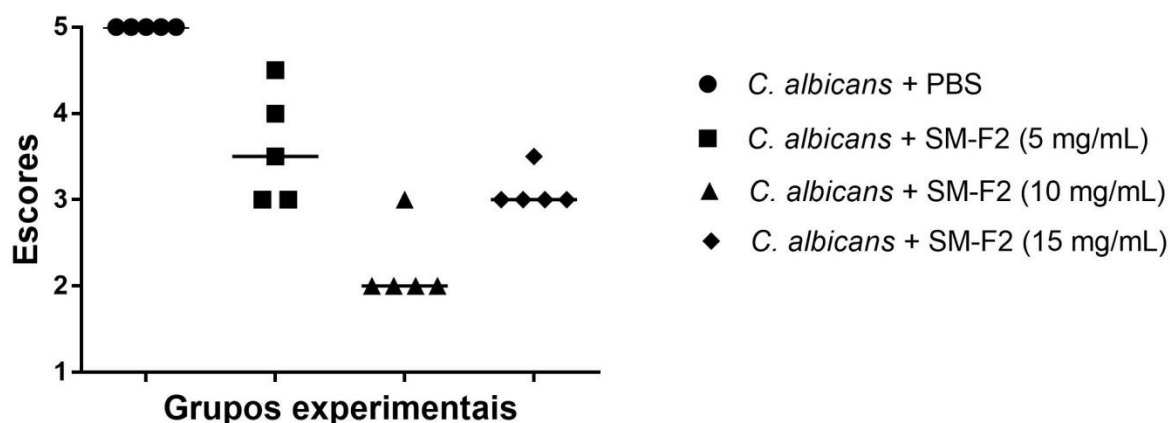
Entretanto, quando *C. albicans* esteve em contato com a fração SM-F2 observamos inibição no número de hifas em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL) em relação ao controle *C. albicans* e PBS (Figura 10). Redução na quantidade das hifas, com diferença estatisticamente significativa, foi observada ao compararmos o grupo tratado com a fração SM-F2 na concentração de 10 mg/mL com o grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 11).

Figura 10 - Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans* quando em contato com a fração SM-F2



Legenda: **A)** Grupo controle formado por *C. albicans* + PBS: podemos observar a prevalência de inúmeras hifas, formando uma extensa rede; **B)** *C. albicans* tratada com SM-F2 (5 mg/mL): observamos 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); Verificamos nas imagens **C** e **D** que a SM-F2 reduziu a formação de hifas. Aumento original: 400x
Fonte: Elaborado pelo autor.

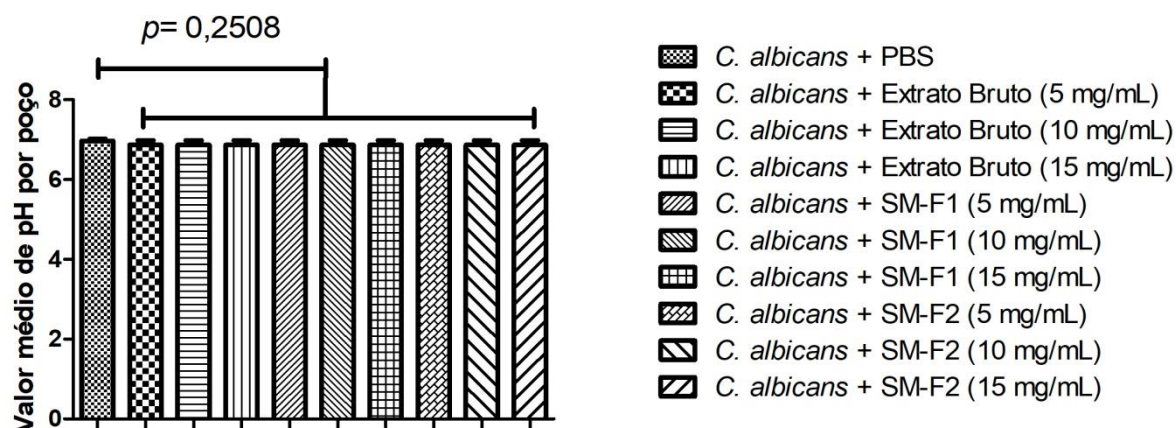
Figura 11 - Quantificação das hifas no ensaio da filamentação de *C. albicans in vitro*



Legenda: Gráfico representando 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, $p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, após 24 h de incubação e antes de realizada a leitura da filamentação, foi verificado o pH do meio de todos os grupos, a fim de observarmos se houve alguma alteração no meio que pudesse interferir na formação das hifas, pois sabe-se que o pH do meio (ácido) pode apresentar capacidade inibitória sobre estas estruturas. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos tratados com extrato bruto e com as frações SM-F1 e SM-F2, comparados ao grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 12). Para todos os tratamentos verificamos valores de pH 6,8 ~ 7,0, enquanto o grupo controle apresentou pH 7,0.

Figura 12 - Valores de pH obtidos nos ensaios de filamentação de *C. albicans* realizados com o extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2



Legenda: Gráfico representando os valores de pH por poço obtidos no ensaio de filamentação nos seguintes grupos: *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), *C. albicans* + SM-F1 (5 mg/mL), *C. albicans* + SM-F1 (10 mg/mL), *C. albicans* + SM-F1 (15 mg/mL), *C. albicans* + SM-F2 (5 mg/mL), *C. albicans* + SM-F2 (10 mg/mL) e *C. albicans* + SM-F2 (15 mg/mL). Reduções nas hifas não foram causadas por variações no pH do meio. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

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

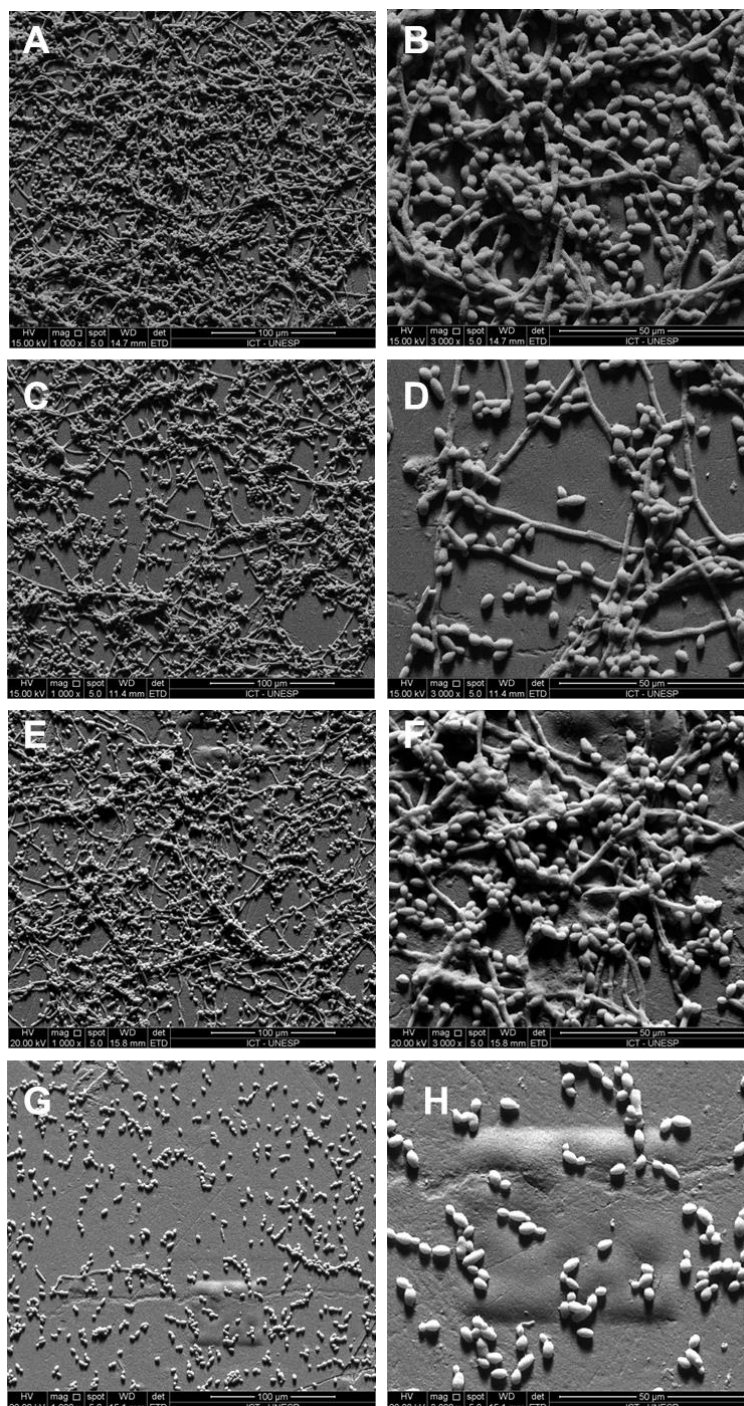
A seguir, foram confirmados os efeitos inibitórios nas hifas de *C. albicans* causados pelo extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

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.

Podemos observar 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 13, **A** – 1000x e **B** – 3000x). Nas imagens em que *C. albicans* esteve em contato com o extrato bruto, observamos que houve redução no número de hifas, bem como na quantidade de leveduras (Figura 13, **C** – 1000x e **D** – 3000x). Redução destas estruturas também foi observada na presença da SM-F1 (Figura 13, **E** – 1000x e **F** – 3000x), enquanto na presença da SM-F2, observamos praticamente a inexistência das hifas, bem como uma expressiva redução das células leveduriformes. Nestas imagens podemos observar a presença de vários espaços livres sobre os discos, evidenciando uma importante redução de *C. albicans* (Figura 13, **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*.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura da filamentação de *C. albicans*



Legenda: **A-B)** Grupo controle de *C. albicans* + PBS: observamos 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): verificamos 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): verificamos redução das leveduras e expressiva redução das hifas. Aumento original: **(G)** 1000x, **(H)** 3000x.

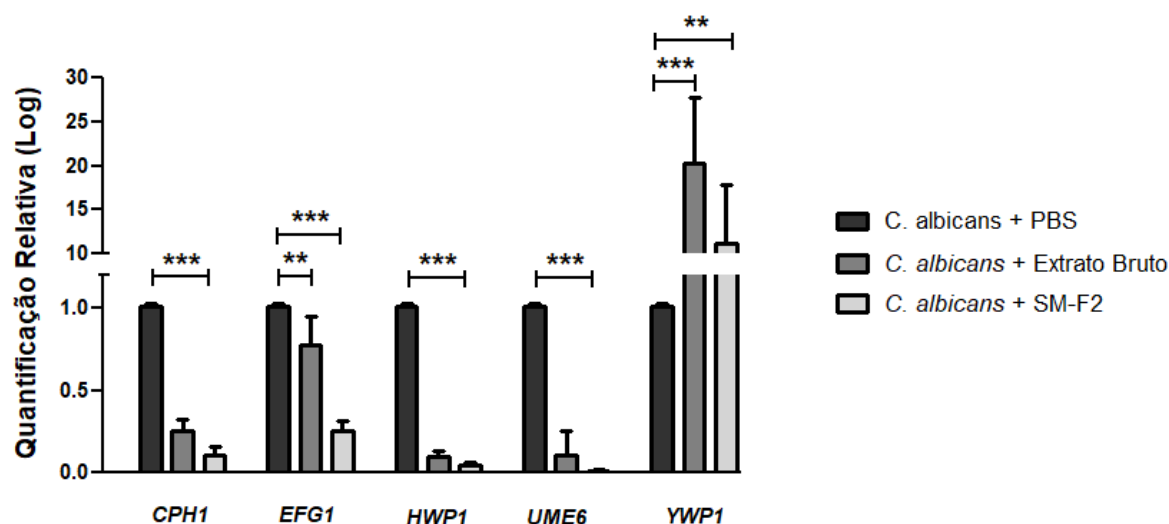
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.9.4 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e SM-F2 sobre a expressão de genes de virulência de *C. albicans*

Uma vez verificado que o extrato bruto e principalmente a SM-F2 foram capazes de inibir as hifas de *C. albicans*, nós investigamos a expressão dos genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1*, envolvidos nesse importante mecanismo de virulência de *C. albicans*, por RT-qPCR. Nesse ensaio, utilizamos o modelo de filamentação descrito anteriormente no item 3.4, utilizando as concentrações de cada composto que apresentaram 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.

Os resultados médios de quantificação relativa (RQ) de todos os genes alvos na presença do extrato bruto e SM-F2 estão demonstrados abaixo (Figura 14).

Figura 14 – 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)



Legenda: Quantificação relativa dos genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1* de *C. albicans*, quando em contato com 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 foram expressos como média e desvio padrão. (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

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*, verificamos 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* foi verificada 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, podemos constatar que tanto o extrato bruto como a SM-F2 foram capazes de induzir os genes de virulência de *C. albicans*.

3.9.5 Avaliação dos efeitos inibitórios do extrato bruto e das frações SM-F1 e SM-F2 de *S. mutans* em biofilmes de *C. albicans*

A formação de biofilmes representa outro importante fator de virulência conferido por *C. albicans*, assim sendo o próximo passo foi verificar a ação do extrato bruto e das frações SM-F1 e SM-F2 sobre a formação de biofilmes de *C. albicans*.

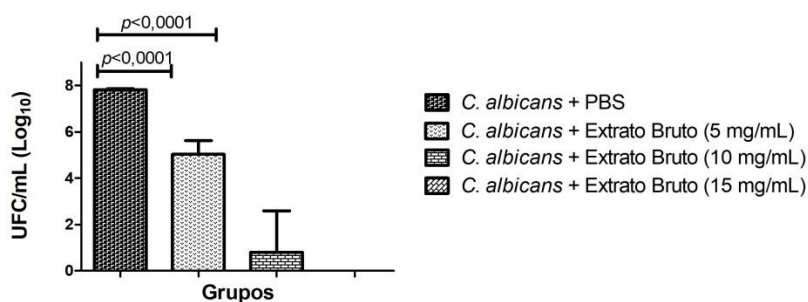
Esse ensaio foi conduzido em placas de 96 poços de fundo plano, onde inicialmente foi realizada adesão inicial de *C. albicans* por 90 min a 37°C, sob agitação. Para promover o crescimento do biofilme, YNB suplementado com 100 mM de glicose foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por 48 h, sendo realizada troca do meio de cultura e adição de extrato ou fração SM-F1 ou SM-F2 após 24 h. Após esse período, os biofilmes foram desprendidos utilizando-se homogeneizador ultra-sônico e diluições seriadas foram realizadas para determinar o número de UFC/mL de *C. albicans*.

Como no ensaio de filamentação realizado anteriormente não houve redução das hifas nas concentrações 1 e 2 mg/mL, para os estudos em biofilmes avaliamos a susceptibilidade de *C. albicans* apenas às concentrações 5, 10 e 15 mg/mL do extrato bruto e frações. Como grupo controle sem tratamento, foi utilizado PBS.

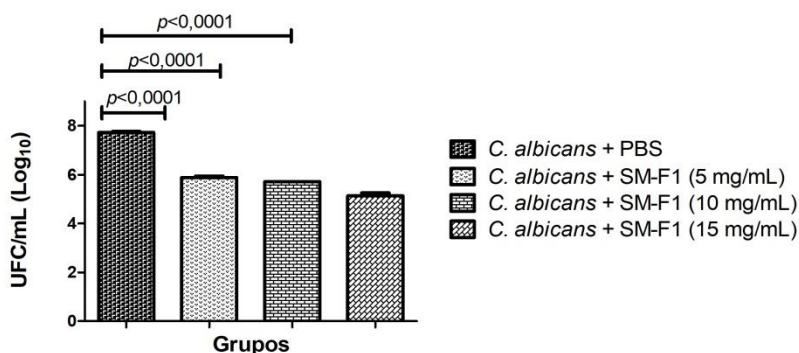
Foram observadas taxas de redução nas contagens de UFC/mL de *C. albicans* quando o biofilme esteve em contato com o extrato bruto em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL), em relação ao grupo controle *C. albicans* e PBS. Houve redução estatisticamente significativa entre os grupos analisados, 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, interessante, redução total, 7,82 Log, para a concentração de 15 mg/mL (Figura 15A). 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 15B). 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 15C).

Figura 15 - Contagem de UFC/mL (Log_{10}) de *C. albicans* em biofilmes formados *in vitro*

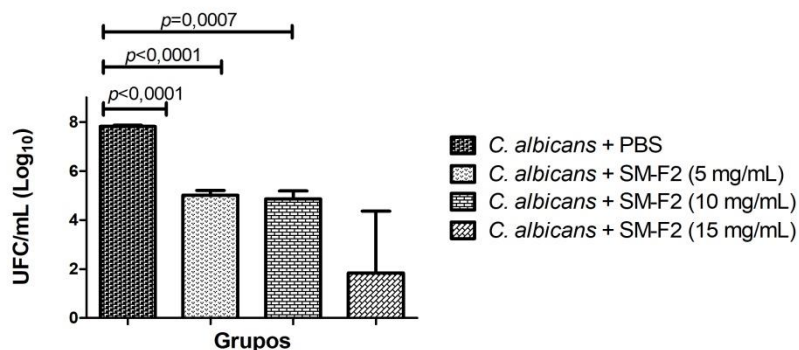
A)



B)



C)



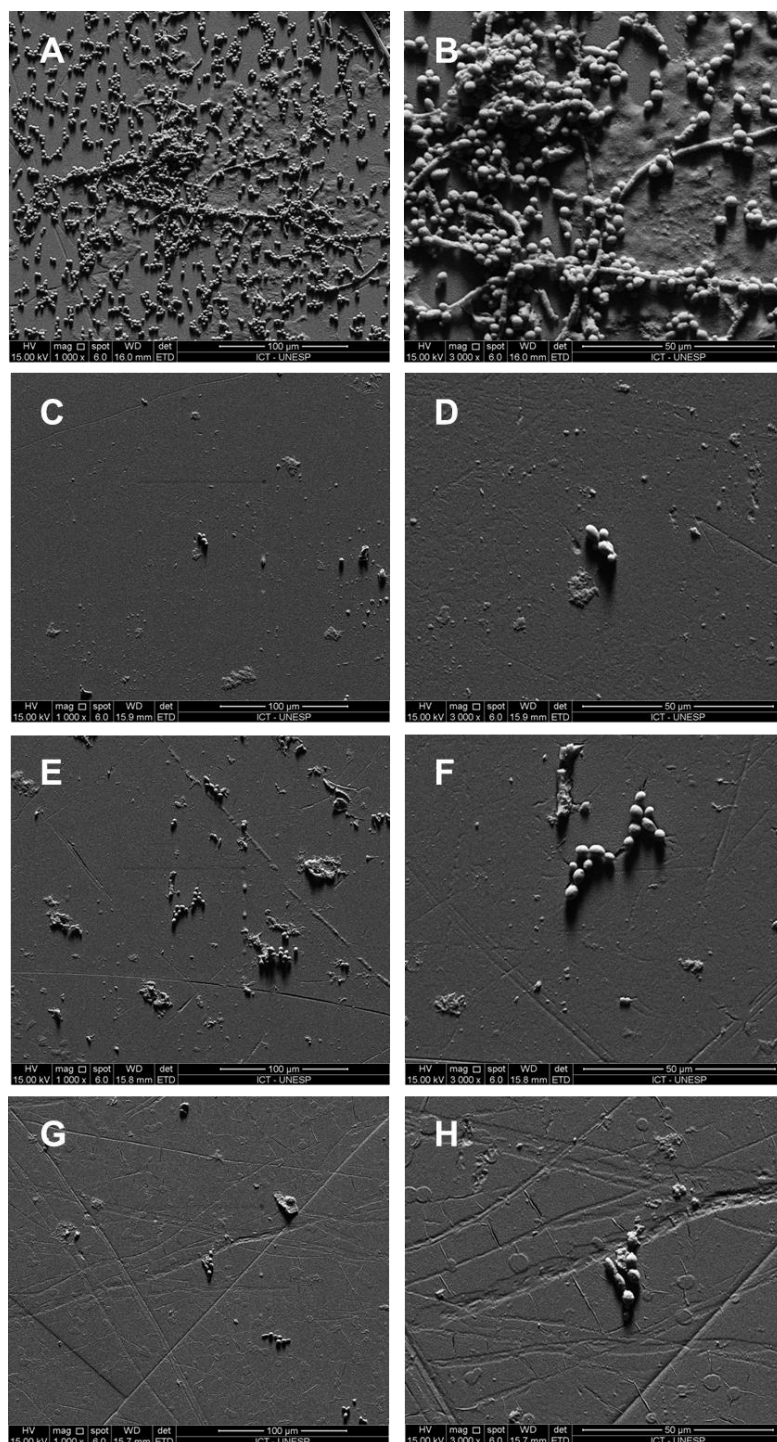
Legenda: Gráfico representando os valores de UFC/mL (Log_{10}) obtidos na formação de biofilme *in vitro* por *C. albicans* nos seguintes grupos: **A)** *C. albicans* + PBS (controle); *C. albicans* + Extrato Bruto (5 mg/mL); *C. albicans* + Extrato Bruto (10 mg/mL); *C. albicans* + Extrato Bruto (15 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, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

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

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 16, **A** – 1000x e **B** – 3000x). Nos biofilmes tratados com extrato bruto (Figura 16, **C** – 1000x e **D** – 3000x) e com a SM-F2 (Figura 16, **E** – 1000x e **F** – 3000x) observamos redução praticamente total das células leveduriformes e nenhuma hifa formada. Nos biofilmes tratados com a SM-F1 (Figura 16, **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.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *C. albicans*



Legenda: **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.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4 DISCUSSÃO

Apesar de *Candida albicans* ser um fungo comensal encontrado nos diversos nichos de indivíduos saudáveis, pode tornar-se patogênico quando as defesas do hospedeiro tornam-se comprometidas ou em condições de disbiose microbiana, ou seja, quando ocorre desequilíbrio entre os micro-organismos, podendo causar desde infecções superficiais leves bem como sistêmicas, associadas a altas taxas de mortalidade. Portanto, as infecções por *C. albicans* acometem principalmente neonatos, idosos e pacientes imunocomprometidos, diabéticos, pós-operados, em tratamento prolongado com antibióticos e corticóides, internados que fazem uso de cateteres, transplantados, até mesmo grávidas e mulheres que utilizam anti-concepcionais (Pfaller, Diekema, 2007; Dignani et al., 2009). Tal enfermidade afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Braunsdorf, Gut-Landmann, 2018) e tanto durante a infecção superficial quanto a sistêmica, *C. albicans* tem sua patogenicidade facilitada pela produção de um arsenal de fatores de virulência, incluindo a capacidade em alterar sua morfologia de levedura para hifa (Nobile, Johnson, 2015; Gulati, Nobile, 2016; Tsui et al., 2016), a produção de enzimas histolíticas como proteinases e fosfolipases, o crescimento estimulado pelo contato íntimo a uma superfície ou substrato, denominado tigmotropismo e a formação de biofilmes. Adicionalmente, alguns atributos importantes ainda incluem a rápida adaptação às flutuações no pH ambiental, flexibilidade metabólica e poderosos sistemas de aquisição e absorção de nutrientes, como fontes de carbono (C), nitrogênio (N), além de outros compostos essenciais como ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn), e maquinaria celular de resposta ao estresse (Mayer et al., 2013).

A habilidade em alternar entre as distintas morfologias (levedura, pseudohifas e hifas) representa um dos fatores de virulência mais investigados em *C. albicans*. Esta plasticidade polimórfica é um determinante crítico de sua virulência, pois a forma hifal desempenha papel fundamental no processo de infecção, promovendo a adesão e posterior penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro e escape do sistema imune (Yang et al., 2014). Consequentemente, o

bloqueio da morfogênese de *C. albicans* durante a infecção representa uma estratégia terapêutica promissora (Saville et al., 2006; Hnisz et al., 2012), pois estudos demonstraram que mutantes com deficiência na formação de hifas são menos eficazes em causar doença (Leberer et al., 1997; Loeb et al., 1999; Whiteway, Oberholzer, 2004; Altenburg et al., 2008). A transição entre as formas de levedura e hifa é primordial para a patogenicidade de *C. albicans*, sendo as hifas essenciais para invadir e penetrar os tecidos do hospedeiro. Cepas mutantes incapazes de formar hifas em condições *in vitro* são geralmente atenuadas de virulência (Lo et al., 1997).

Em estudos anteriores do nosso laboratório, Barbosa et al. (2016) demonstraram que o sobrenadante da cultura de *S. mutans* inibiu *C. albicans*, interferindo na sua capacidade de filamentação e formação de biofilme *in vitro*. Além disso, esses autores verificaram que a inoculação de células de *S. mutans* ou sobrenadante da cultura de *S. mutans* em larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* aumentou a sobrevivência desses animais. Estes autores verificaram que houve diminuição na formação de hifas nos tecidos de *G. mellonella* quando administrado o sobrenadante da cultura de *S. mutans*, sugerindo que *S. mutans* secretam subprodutos no meio de cultura com ação antifúngica. Diante de tais achados, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de metabólitos produzidos por *S. mutans* sobre alguns mecanismos de virulência de *C. albicans*. Desse modo, o extrato bruto e as frações obtidas a partir do sobrenadante da cultura de *S. mutans* foram avaliados utilizando ensaios *in vitro* de filamentação, formação de biofilme e expressão dos genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1* de *C. albicans*.

S. mutans, assim como outras bactérias, produzem bacteriocinas, peptídeos que agem como antimicrobianos naturais (Soto et al., 2017) inibindo outras espécies microbianas através de competição, a fim de manter seu nicho (Kreth et al., 2006).

Sendo assim, a ação antifúngica do extrato bruto e das frações obtidas foi testada em cepa padrão de *C. albicans* ATCC18804. Inicialmente, nós investigamos a ação do extrato bruto sobre a filamentação de *C. albicans* testando diferentes concentrações de extrato: 1, 2, 5, 10 e 15 mg/mL. Na análise microscópica, nós verificamos que houve redução na filamentação de *C. albicans* nas concentrações 5,

10 e 15 mg/mL, verificando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado com extrato na concentração 5 mg/mL comparado ao grupo controle *C. albicans* e PBS. Após verificarmos que o extrato bruto foi capaz de inibir as hifas de *C. albicans*, nosso próximo objetivo foi investigar a ação das frações nesse importante mecanismo de virulência. Analisando as imagens microscópicas, verificamos que quando em contato com a fração SM-F1 nas concentrações 10 e 15 mg/mL, houve redução da filamentação, ou seja, a rede de hifas apresentava-se menos compactada, com aspecto mais frouxo, quando comparamos ao controle. Na análise quantitativa dos escores, verificamos que a fração SM-F1 foi capaz de reduzir as hifas de *C. albicans* nas concentrações 10 e 15 mg/mL, porém não foi estatisticamente significativo. Entretanto, quando *C. albicans* esteve em contato com a fração SM-F2 observamos inibição no número de hifas em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL), sendo estatisticamente significativa na concentração 10 mg/mL. Esses dados confirmam os achados *in vitro* encontrados em estudos anteriores, (Pereira-Cenci et al., 2008; Jarosz et al., 2009; Joyner et al., 2010; Barbosa et al., 2016), os quais demonstraram que *S. mutans* podem secretar substâncias capazes de inibir a filamentação de *C. albicans*.

Sabe-se que uma série de condições afetam a morfologia de *C. albicans*. Por exemplo, em pH baixo (< 6), as células de *C. albicans* crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto que em pH alto (> 7) o crescimento de hifas é induzido (Odds, 1988; Mayer et al., 2013). A falta de nutrientes, a presença de soro (ex: soro fetal bovino) ou N-acetilglicosamina, temperatura fisiológica (37°C) e presença de CO₂ promovem a formação de hifas (Sudbery, 2011). Além disso, a morfogênese também mostrou ser regulada pelo *quorum sensing* (Albuquerque, Casadevall, 2012). Entretanto, nesse trabalho a inibição das hifas de *C. albicans* pelos tratamentos não pode ser atribuída às variações de pH do meio de cultura nos ensaios de filamentação, uma vez que nossos resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos tratados com extrato bruto, com as frações SM-F1 e SM-F2, comparados ao grupo controle sem tratamento.

Os efeitos inibitórios nas hifas de *C. albicans* causados pelo extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2 também foram avaliados por Microscopia Eletrônica de

Varredura (MEV), onde observamos no grupo controle sem tratamento a presença de grande quantidade de leveduras e rede de hifas bastante extensa e compactada. Foi possível observar redução no número de leveduras e hifas quando *C. albicans* esteve em contato com o extrato bruto (5 mg/mL). Com a utilização da SM-F1 (15 mg/mL) também observamos redução destas estruturas, porém interessantemente, quando utilizamos a SM-F2 (10 mg/mL) observamos praticamente a inexistência das hifas, bem como uma expressiva redução das células leveduriformes. Nas imagens obtidas podemos verificar a presença de inúmeros espaços livres sobre os discos, evidenciando uma importante redução de *C. albicans*. Apesar de nesse ensaio as concentrações utilizadas do extrato bruto e frações serem diferentes, foi possível observar reduções nas quantidades das leveduras e hifas. Uma possível hipótese para a expressiva redução causada pela SM-F2, mesmo estando em uma concentração menor que a SM-F1, pode ser devido à presença de uma ou mais substâncias com maior potencial antifúngico na SM-F2.

Para elucidar os potenciais mecanismos envolvidos na inibição da formação das hifas de *C. albicans* pelo extrato bruto e SM-F2, nós investigamos o nível de expressão de cinco genes, *CPH1*, *EFG1*, *HWP1*, *UME6* e *YWP1*, envolvidos nesse importante mecanismo de virulência.

Uma variedade de estímulos ambientais e do hospedeiro é responsável por induzir a diferenciação levedura-hifa, sendo controlada por várias cascatas de transdução de sinal e mais de trinta reguladores transcricionais, resultando na indução de genes específicos das hifas (Brown, 2002; Biswas et al., 2007; Whiteway, Bachewich, 2007; Homann et al., 2009; Noble et al., 2010; Shapiro et al., 2011; Childers, Kadosh, 2015). A morfogênese desempenha importante papel na formação de biofilme e na patogenicidade de *C. albicans*, sendo a maturação dessa estrutura conferida pela expressão do gene *EFG1*, o qual é um regulador transcricional envolvido na morfogênese, responsável por modular a diferenciação das hifas (Blankenship, Mitchell, 2006; Nobile et al., 2008; Barros et al., 2018a). Outros dois importantes reguladores transcricionais específicos dessas estruturas são os genes *CPH1* e *UME6*, sendo sua deleção responsável por reduzir o crescimento das hifas de *C. albicans* (Tsai et al., 2013; Ladernois et al., 2015). Banerjee et al. (2013) demonstraram que à medida que os níveis de expressão do

gene *UME6* aumentam, as células de *C. albicans* fazem a transição de levedura para hifas, com consequente aumento na formação de biofilme *in vitro*. Nesse estudo, cepas de *C. albicans* expressando níveis elevados de *UME6* promoveram invasão tecidual em um modelo tridimensional de mucosa oral humana.

O gene *HWP1* codifica uma proteína de parede das hifas (proteína 1) essencial para seu desenvolvimento (Nobile et al., 2006b), sendo envolvida em uma variedade de funções, como a sinalização intracelular, atuação como adesina favorecendo a ligação de *C. albicans* às células epiteliais, auxiliando na resistência à morte mediada por macrófagos e na patogenicidade, sendo transcrito especificamente durante o desenvolvimento da hifa (Orsi et al., 2014). Nobile et al. (2008) reportaram que esse gene também possui significativa atuação na formação do biofilme, pois sua superexpressão melhorou a formação do biofilme. Já cepas mutantes para esse gene resultaram em defeitos parciais em biofilmes *in vitro*, sendo graves quando estudaram biofilmes em modelo de infecção por cateter venoso central em ratos. Outros estudos demonstraram que cepas mutantes para este gene foram avirulentas quando comparadas a cepa controle selvagem (Tsuchimori et al., 2000; Sundstrom et al., 2002; Orsi et al., 2014). Recentemente, Lee et al. (2018) demonstraram que dois compostos ativos do gengibre, 6-gingerol e 6-shogaol, inibiram a formação de hifas e biofilme de *C. albicans*, com consequente repressão do gene *HWP1* em mais de 7 vezes.

Já o gene *YWP1* codifica uma abundante glicoproteína de parede celular das formas leveduriformes de *C. albicans*, sendo ausente nas formas filamentosas. A expressão desse gene confere uma capacidade anti-adesiva à parede, com possível ação na dispersão das leveduras, uma vez que mutantes para esse gene são mais adesivos e formam um biofilme mais espesso (Granger, 2012).

Consistente com as inibições das hifas encontradas nos ensaios de filamentação anteriores, nós verificamos alterações significativas na expressão dos genes envolvidos no mecanismo de filamentação. Nossos resultados demonstraram que o extrato bruto e SM-F2 regularam negativamente (down-regulated), ou seja, reprimiram a expressão dos genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1* e *UME6*, em contrapartida, interessantemente, regularam positivamente (up-regulated) induzindo a expressão do gene *YWP1*.

Os genes *CPH1*, *EFG1*, *HWP1* e *UME6* estão envolvidos na morfogênese de *C. albicans*, sendo essenciais para o desenvolvimento das hifas e sua expressão está correlacionada com o alongamento celular e a formação de biofilme (Nobile et al., 2006a; Lee et al., 2018). A repressão desses genes pelo extrato bruto e SM-F2 é consistente com a inibição das hifas observadas anteriormente no ensaio da filamentação. De acordo com os resultados, nós verificamos que a SM-F2 inibiu mais os genes de virulência de *C. albicans* em relação ao tratamento com o extrato bruto. Já o gene *YWP1* desempenha papel fundamental na adesão e dispersão das leveduras em biofilmes, sendo altamente expresso durante a fase exponencial de crescimento e fortemente reprimido sob condições que promovem a filamentação (Granger et al., 2005; Granger, 2012). Observamos que o extrato bruto induziu mais o gene *YWP1* ao invés da SM-F2. Uma explicação para esses achados pode ser devido à presença de uma maior quantidade de substâncias (*pool*) no extrato bruto, as quais em conjunto estimularam os mecanismos de anti-adesividade de *C. albicans*. Já a SM-F2 pode conter uma ou mais substâncias específicas com capacidade inibitória sobre as hifas. Portanto, esses dados suportam a hipótese de que o extrato bruto e a SM-F2 de *S. mutans* contém substâncias com atividade antifúngica, as quais foram capazes de regular os genes de virulência de *C. albicans* e podem regular alterações morfológicas condizentes com a inibição das hifas e consequente diminuição da virulência de *Candida*.

Alguns autores reportaram inibição da filamentação de *C. albicans*, com supressão de genes essenciais à produção das hifas quando em contato com sobrenadante da cultura de cepas de *Lactobacillus*. A cepa *L. paracasei* 28.4 suprimiu a expressão dos genes *TEC1* e *UME6* (Barros et al., 2018b) e *L. crispatus* suprimiu a expressão dos genes *ALS3*, *HWP1*, e *ECE1* (Wang et al., 2017).

A formação de biofilmes representa outro importante fator de virulência conferido por *C. albicans*, assim sendo, o próximo passo foi avaliar a ação do extrato bruto e das frações SM-F1 e SM-F2 sobre a formação de biofilmes de *C. albicans*. A contagem de células viáveis (UFC) consiste no método mais comumente utilizado para analisar o desenvolvimento de biofilmes de *Candida* e testar a eficácia de novas estratégias terapêuticas (Costa et al., 2013). Neste método, as células

aderidas do biofilme são desprendidas através de sonicação, semeadas em placas contendo meio de cultura e incubadas para a contagem de UFC.

Nas análises de UFC/mL, os resultados demonstraram redução nas contagens de *C. albicans* nos biofilmes formados por *C. albicans* quando em contato com o extrato bruto, frações SM-F1 e SM-F2 em todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg/mL).

Houve redução significativa de *C. albicans* quando em contato com extrato bruto em todas as concentrações utilizadas, sendo 2,79 Log na concentração 5 mg/mL, 7,02 Log na concentração 10 mg/mL e interessante, verificamos redução total nas células viáveis de *C. albicans*, 7,82 Log na concentração 15 mg/mL. Quando o biofilme esteve em contato com a fração SM-F1, houve redução estatisticamente significativa em todas as concentrações, sendo 1,85 Log na concentração 5 mg/mL, 2,02 Log na concentração 10 mg/mL e 2,59 Log na concentração 15 mg/mL. Quando em contato com a fração SM-F2, também houve redução significativa nas contagens de UFC/mL em todas as concentrações. Houve redução de 2,80 Log na concentração 5 mg/mL, 2,95 Log na concentração 10 mg/mL e, 5,98 Log na concentração 15 mg/mL. Diante desses achados, evidenciamos que o extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2 foram capazes de reduzir as células viáveis do biofilme, indicando novamente que compostos bioativos devem estar presentes em suas composições. Nesse ensaio o extrato bruto apresentou forte atividade anti-biofilme, reduzindo totalmente as células de *C. albicans* na concentração 15 mg/mL. Uma explicação para este fato pode ser em decorrência do extrato bruto conter em sua composição quantidades maiores de substâncias, as quais estariam atuando de maneira sinérgica conforme discutimos anteriormente, agindo tanto na morfologia quanto na adesividade da parede celular, tornando sua ação mais eficiente.

Os biofilmes também foram avaliados por MEV, e de acordo com as imagens obtidas observamos a presença de inúmeras leveduras e algumas hifas de *C. albicans* no grupo sem tratamento. Já os tratamentos com o extrato bruto, SM-F1 e SM-F2 foram capazes de reduzir a adesão das células de *C. albicans* na superfície abiótica utilizada para formação dos biofilmes, o que provavelmente causou a redução na contagem de UFC/mL. As maiores reduções foram obtidas quando

utilizamos o extrato bruto e a SM-F2 (15 mg/mL), onde verificamos expressiva redução das leveduras e a inexistência das hifas. Esses achados comprovam mais uma vez que o *S. mutans* produz substâncias com atividade antifúngica e que foram extraídas no método utilizado nesse trabalho. Além disso, nós podemos pensar na hipótese que os efeitos antibiofilme podem ter sido em decorrência do conjunto prevenção da transição levedura-hifa dados pela repressão dos genes de virulência de *C. albicans* e consequente indução do gene *YWP1*, o qual confere anti-adesividade à parede das leveduras. Segundo Rane et al. (2014), a inibição da aderência de *C. albicans* é um alvo promissor para interromper os estágios iniciais de formação de biofilme por esse micro-organismo.

A adesão e a formação de biofilme são etapas essenciais para a persistência e patogênese deste fungo na população humana (Granger, 2012). Importaneamente, todas as formas morfológicas de *C. albicans* desempenham importantes funções na formação de biofilmes, sendo que as leveduras são importantes para sua disseminação através da corrente sanguínea (Chandra et al., 2001; Ramage et al., 2005; Altenburg et al., 2008). Desse modo, os biofilmes normalmente iniciam-se com as leveduras aderidas a um substrato biótico, como a superfície das mucosas ou abióticas, sobre cateteres e próteses. Em seguida, desenvolvem-se em formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) à medida que se proliferam. As células ficam aderidas a uma matriz polimérica extracelular fazendo com que os micro-organismos tolerem condições ambientais hostis, além de tratamentos antimicrobianos, tornando difícil a sua erradicação (Chandra et al., 2001; Douglas, 2003; Blankenship, Mitchel, 2006). Tais propriedades de adesão das leveduras são relevantes tanto para a adesão inicial quanto para a posterior dispersão e, portanto, têm um papel importante na patogênese desse organismo (Granger, 2012).

Portanto, são necessários esforços cujo foco seja encontrar novos agentes terapêuticos os quais sejam capazes de solucionar as infecções mediadas por biofilmes. Além disso, em contraste a gama de fármacos antibacterianos, o arsenal de antifúngicos é extremamente pequeno e sua eficácia é limitada devido a taxas de toxicidade bem como o surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos (Sanglard, Odds, 2002; Pierce et al., 2013; Pierce et al., 2015). Diante disso,

investigações envolvendo agentes antifúngicos alternativos, especialmente os antivirulentos e antibiofilmes têm atraído considerável interesse de pesquisa. Em geral, *C. albicans* é sensível aos antifúngicos, porém casos de resistência aos antifúngicos azóis mais comumente utilizados, como fluconazol e itraconazol, têm sido relatados principalmente em pacientes expostos a longos períodos de tratamento (Sanglard, Odds, 2002).

A caspofungina, um derivado semi-sintético da pneumocadina, produto da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis*, mostrou-se ativa contra biofilme de *C. albicans*, sendo o primeiro inibidor fúngico aprovado para tratamento de candidíase invasiva (Bachmann et al., 2002; Premnath et al., 2018). Pierce et al. (2015) identificaram a partir da Biblioteca NOVA Core da Chembridge Corporation diferentes compostos antifúngicos capazes de inibir a formação de biofilme e filamentação de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidíase disseminada e pacientes HIV positivos com candidíase orofaríngea.

Contudo, estudos envolvendo a obtenção de metabólitos obtidos a partir de micro-organismos vêm sendo cada vez mais estudados, uma vez que bactérias e fungos produzem uma gama de moléculas bioativas no ambiente extracelular e podem ser alvos promissores como pontos de partida para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Debbab et al., 2010; Harvey et al., 2015; Rangnekar, Khan, 2015). Muitas destas moléculas são descritas por exercerem ação antimicrobiana atuando na defesa do habitat intercelular, além de agirem como moléculas sinalizadoras do *quorum sensing*, resultando em melhor aptidão e sobrevivência dos competidores. No entanto, suas funções biológicas nas complexas comunidades microbianas ainda permanecem um grande desafio para a comunidade científica (Schroeckh et al, 2009). Interessantemente, seguindo outra linha de raciocínio, Premnath et al. (2018), demonstraram que inibindo a síntese das mutacinas produzidas por *S. mutans* poderia ser uma estratégia útil para prejudicar sua aptidão em biofilmes dentários. Um total de 297 compostos selecionados em três bibliotecas de produtos naturais foi testado quanto à capacidade de suprimir a síntese de mutacina VI produzida por *S. mutans*. Dentre os 297 compostos, sete suprimiram esse composto, porém apenas um, a erinacina C foi escolhida para testes posteriores. A erinacina C também suprimiu a transcrição de duas outras mutacinas

de *S. mutans*, a mutacina IV (descrita por ser bactericida sobre *Streptococcus*) e V (descrita por ser bactericida sobre espécies de *Lactococcus*).

Jeong et al. (2017) purificaram e identificaram o ácido benzoico, proveniente do extrato bruto do sobrenadante da cultura de *Bacillus licheniformis*, utilizando ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa (EM) e cromatografia gasosa (CG). Esses autores verificaram intensa atividade antifúngica com ação na inibição de hifas de fitopatógenos, *Rhizoctinia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Atiphasaworn et al. (2017) avaliaram 14 extratos brutos obtidos de fungos endofíticos quanto à atividade antibacteriana sobre patógenos humanos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*. Todos os extratos brutos apresentaram atividade antibacteriana sobre as espécies citadas acima, no entanto, o extrato bruto obtido do fungo *Nigrospora* sp. apresentou atividade antibacteriana superior aos outros e com amplo espectro de ação. Além disso, elevada atividade antioxidante foi verificada neste extrato. Esses autores identificaram um total de 62 compostos, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Graham et al. (2017) identificaram a bacteriocina EntV de *E. faecalis* com capacidade de inibir biofilme de *C. albicans*, e atribuíram essa atividade à inibição das hifas. O mecanismo anti-hifa não está totalmente esclarecido, e embora não faça lisar as células fúngicas (Dundar et al., 2015), o EntV exerceu efeito antivirulento sobre *C. albicans* (Graham et al., 2017). Esses resultados concordam com os resultados do nosso trabalho, uma vez que além da inibição das hifas nós obtivemos reduções nas contagens de UFC/mL, sendo estas últimas ocasionadas provavelmente pela perda de adesividade da parede fúngica. Assim, estratégias as quais interfiram na virulência podem ser menos propensa a resistência microbiana (Graham et al., 2017).

Conforme solvente utilizado em nosso trabalho, acetato de etila foi o melhor solvente utilizado por Wahaab et al. (2018) para extrair os metabólitos do extrato bruto de cepas de *Actinomycetes*, descritas por exercerem atividade contra diversos patógenos resistentes a diversos fármacos. Utilizando cromatografia em camada delgada esses autores identificaram a presença de macrolídeos, terpenóides e

quinolonas. Já na análise CG-EM foi possível identificar o compostos fenólico-2,6-di-tert-butilfenol, o alcalóide-1H, 5H, pyrrol (1'2' : 3,4) imidazol e a quinolona-1,4-benzenodiol, 2,5-bis (1,1-dimetiletil).

Shekh e Roy (2012) purificaram e caracterizaram uma proteína anti-*Candida* do extrato obtido a partir do sobrenadante de *Enterococcus faecalis*. Esse extrato foi capaz de inibir 7 cepas de *C. albicans* resistentes à vários antifúngicos. E por fim, Ström et al. (2002) isolaram 3 compostos antifúngicos do sobrenadante da cultura de *Lactobacillus plantarum*, os quais apresentaram efeitos contra fungos filamentosos e leveduras.

No nosso trabalho, apesar do alto número de picos em todos os cromatogramas, foi possível apenas a identificação de alguns, já que a similaridade era muito baixa quando os mesmos eram comparados com possíveis substâncias descritas nas bases de dados. Não há um grande número de substâncias de extrato de micro-organismos que foram identificadas e inseridas nessas bases de dados, e ainda, há a possibilidade de algumas dessas substâncias serem inéditas, por isso não foi possível a identificação de um número maior de metabólitos. Na análise por CG-EM do extrato bruto e da SM-F2 foram encontradas duas substâncias, as quais diferiram do grupo controle, contendo apenas caldo BHI. Já na SM-F1, cinco substâncias diferentes foram identificadas. Ácido octanóico e uridina foram as substâncias identificadas no extrato bruto; ácido propanóico, (3R)-3-Methyl-1,4-bis(trimethylsilyl)piperazine-2,5-dione, pirimidina, gulose e oleamida foram identificadas na SM-F1; ácido nicotínico e triptofano, na SM-F2.

O ácido octanóico, também denominado ácido caprílico é um ácido graxo de cadeia média, reconhecido como antimicrobiano natural sendo utilizado por várias décadas como conservante em alimentos (Kabara, Marshall, 2004). Além disso, é encontrado naturalmente em altas concentrações no leite materno, leite bovino e óleo de coco (Zentek et al., 2011). Atividade antimicrobiana dessa substância foi reportada na literatura contra amplo espectro de bactérias, incluindo *Cronobacter sakazakii*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* (Nair et al., 2004; Jang, Rhee, 2009; Huang, Chen, 2011; Kim, Rhee, 2015).

Derivados de uridina têm sido relatados como promissora abordagem terapêutica antiviral contra o vírus influenza A, uma infecção altamente contagiosa

com altas taxas de morbidade e mortalidade nos seres humanos e animais no mundo todo (Krol et al., 2017). Esse mesmos autores, em 2018 verificaram propriedades antivirais desses compostos contra o vírus da hepatite C, maior causa de doenças hepáticas crônicas. Esses achados foram associados à inibição do mecanismo de glicosilação, podendo ser um bom alvo para novas terapias não somente para os vírus acima citados, mas outros patógenos virais dotados de envelope com elevadas proteínas glicosiladas (Krol et al., 2018).

Wang et al. (2014) demonstraram que *Propionibacterium acnes*, uma bactéria comensal da pele humana produziu ácido propiônico, também conhecido como ácido propanóico, o qual inibiu o crescimento de *S. aureus* USA300 resistente à meticilina através da redução do pH intracelular, além de exercer atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *E. coli*.

Derivados da pirimidina e oleamida também apresentaram atividades antibacteriana e antifúngica satisfatórias (Ferreira et al., 2014; Shetty et al., 2016; Abdelhamid et al., 2016; Okasha et al., 2016).

Soliman e Elsilk (2018) sintetizaram dois complexos contendo prata com ligantes derivados do ácido nicotínico (niacina ou vitamina B3), substância esta encontrada na SM-F2. Esses autores verificaram que ambos complexos apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica maior do que com os ligantes livres, sobre diferentes bactérias e *C. albicans*.

Peptídeos antimicrobianos são pequenos peptídeos com amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus, podendo exibir atividade citotóxica contra células cancerígenas, sendo fortes candidatos a complementar ou substituir antimicrobianos atuais (Arias et al., 2016; Shagaghi et al., 2016). Peptídeos ricos em triptofano apresentam potente atividade antimicrobiana, devido suas propriedades bioquímicas às quais permitem atravessar as membranas microbianas e atuarem intracelularmente sem comprometer sua integridade, agindo possivelmente nos ácidos nucleicos e enzimas (Shagaghi et al., 2016; Mishra et al., 2018).

Os resultados do nosso estudo demonstraram que o extrato bruto e frações de *S. mutans* apresentaram efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, bloqueando importantes fatores de virulência como a filamentação e formação de biofilme. Esses

dados evidenciam que *S. mutans* produz substâncias com ação antifúngica, tornando-o promissor na busca por novos compostos antimicrobianos que possam ser utilizados na prevenção e tratamento das candidoses humanas.

5 CONCLUSÃO

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

- a) a técnica utilizada para a obtenção do extrato bruto foi eficiente para a extração dos compostos do sobrenadante da cultura de *S. mutans*, confirmando que *S. mutans* secretam compostos antifúngicos;
- b) o extrato bruto e as frações SM-F1 e SM-F2 apresentaram ação antifúngica sobre *C. albicans* nos ensaios de filamentação, formação de biofilme e expressão gênica;
- c) entre as frações, a SM-F2 apresentou maior atividade inibitória sobre *C. albicans*;
- d) foram identificadas as seguintes substâncias: ácido octanóico e uridina no extrato bruto, ácido propanóico, (3R)-3-Methyl-1,4-bis(trimethylsilyl)piperazine-2,5-dione, pirimidina, gulose e oleamida na SM-F1 e ácido nicotínico e triptofano na SM-F2. Atividades antibacteriana e antifúngica para estas substâncias foram encontradas na literatura.

REFERÊNCIAS*

- Abdelhamid AO, Sayed IEE, Hussein MZ. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Thiadiazoles, Thioamides, 5-Arylazothiazoles and Pyrimido[4,5-d][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidines. *Molecules*. 2016;21(8).pii:E1072
- Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol* 2012;50:337-45. doi: 10.3109/13693786.2011.652201. PMID:22268493;
- Altenburg SD, Nielsen-Preiss SM, Hyman LE. Increased filamentous growth of *Candida albicans* in simulated microgravity. *Geno Prot Bioinfo*. 2008;6(1):42-50.
- Arias M, Hoffarth ER, Ishida H, Aramini JM, Vogel HJ. Recombinant expression, antimicrobial activity and mechanism of action of tritrypticin analogs containing fluoro-tryptophan residues. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(5):1012-23.
- Assaf D, Steinberg D, Shemesh M. Lactose triggers biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Int Dairy J*. 2015;42:51-57.
- Atiphasaworn P, Monggoot S, Gentekaki E, Brooks S, Pripdeevech P. Antibacterial and antioxidant constituents of extracts of Endophytic Fungi Isolated from *Ocimum basilicum* var. *thrysiflora* Leaves. *Curr Microbiol*. 2017;74(10):1185-93.
- Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3591-6.
- Banerjee M, Thompson DS, Lazzell A, Carlisle PL, Pierce C, Monteagudo C, et al. UME6, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell*. 2008;19(4):1354-65.
- Banerjee M, Uppuluri P, Zhao XR, Carlisle PL, Vipulanandan G, Villar CV, et al. Expression of UME6, a Key Regulator of *Candida albicans* Hyphal Development, Enhances Biofilm Formation via Hgc1- and Sun41- Dependent Mechanisms. *Eukaryotic Cell*. 2013; 12(2):224-232.
- Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, de Alvarenga JA, Velloso Mdos S, Prata MC, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016;11: e0150457.
- Barros PP, Ribeiro FC, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression in in vitro biofilms. *Arch Oral Biol*. 2016;64:92-101.
- Barros PP, Rossoni RD, Freire F, Ribeiro FC, Lopes LAC, Junqueira JC, et al. *Candida tropicalis* affects the virulence profile of *Candida albicans*: An in vitro and in vivo study. *Pathog Dis*. 2018a;76:1-9.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro FC, Fugisaki LRO, Fuchs BB, Mylonakis E, et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microbial Pathogenesis*. 2018b;117:80-87.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1001-9.

Bekal-Si Ali S, Hurtubise Y, Lavoie MC, LaPointe G. Diversity of *Streptococcus mutans* bacteriocins as confirmed by DNA analysis using specific molecular probes. *Gene*. 2002;283(1-2):125-31.

Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(2):348–76.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(6):588-94.

Braunsdorf C, Gut-Landmann SL. Modulation of the Fungal-Host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens*. 2018;7(1). pii: E11. doi: 10.3390/pathogens7010011.

Brown AJ. Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002.95–106.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001;183:5385–94.

Chen S, Wilson-Stanford S, Cromwell W, Hillman JD, Guerrero A, Allen CA, et al. Site-directed mutations in the lanthipeptide mutacin 1140. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:4015–23.

Childers DS, Kadosh D. Filament condition-specific response elements control the expression of NRG1 and UME6, key transcriptional regulators of morphology and virulence in *Candida albicans*. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0122775.

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013;4(5):391-9.

de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):1024–28.

Debbab A, Aly AH, Lin WH, Proksch P. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microb Biotech*. 2010;3:544-63.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie, EJ, McGinnis, MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2009.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11:30–6.

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 EF₁₀₉₇ into the mature antimicrobial peptide enterocin O16. *J Bacteriol*. 2015;197(13):2112-21.

Escano J, Stauffer B, Brennan J, Bullock M, Smith L. The leader peptide of mutacin 1140 has distinct structural components compared to related class I lantibiotics. *Microbiologyopen*. 2014;3:961–72.

Falsetta LM, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, Gonzalez-Begne M, Watson G, Krysan DJ, Bowen WH, Koo H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect and Immun*. 2014; 82(5):1968-81.

Ferreira BS, Almeida AM, Nascimento TC, de Casto PP, Silva VL, Diniz CG, et al. Synthesis and biological evaluation of a new series of N-acyldiamines as potential antibacterial and antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24:4626-29.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microb Infect*. 2010;12(6):488-96.

Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(17):4507-12.

Granger BL, Flenniken ML, Davis DA, Mitchell AP, Cutler JE. Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2005;151:1631–44.

Granger BL. Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 2012;11(6):795-805.

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 surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6357-67.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016;18:310-21.

Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn, RJ. The reemergence of natural products for drug Discovery in the genomics era. *Nat Ver Drug Discov*. 2015;14:111-29.

Hazan I, Sepulveda-Becerra M, Liu H. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2002;13:134-45.

Hillman JD, Novak J, Sagura E, Gutierrez JA, Brooks TA, et al. Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1998;66:2743–9.

Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Scho U, et al. A Histone Deacetylase Adjusts Transcription Kinetics at Coding Sequences during *Candida albicans* Morphogenesis. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003118.
doi:10.1371/journal.pgen.1003118

Homann OR, Dea J, Noble SM, Johnson AD. A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000783.

Huang Y, Chen H. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. *Food Control*. 2011;22, 1178-83.

Hwang G, Liu Y, Kim D, Li Y, Krysan DJ, Koo H. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog*. 2017;13(6):e1006407.

Jang HI, Rhee MS. Inhibitory effect of caprylic acid and mild heat on *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in reconstituted infant formula and determination of injury by flow cytometry. *Int J Food Microbiol*. 2009;133:113-20.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*. 2009;8:1658-64.

Jeong MH, Lee YS, Cho JY, Ahn YS, Moon JH, Hyun HN, et al. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2017;110:645-53.

Jiang S, Huang X, Zhang C, Cai Z, Zou T. Morphological and proteomic analyses of the biofilms generated by *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free adults. *J Dent Sci*. 2015;10:206-15.

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.

Kabara, J.J., Marshall, D.L. Medium-chain fatty acids and esters. In: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL. (Eds.), *Antimicrobials in Food*. 3^a ed. New York: CRC;2004.p.327-60.

Kamiya RU, Hofling JF, Gonçalves RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin-producing phenotypes. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 5):626-35.

Kim SA, Rhee MS. Synergistic antimicrobial activity of caprylic acid in combination with citric acid against both *Escherichia coli* O157:H7 and indigenous microflora in carrot juice. *Food Microbiology*. 2015;49:166-72.

Klein MI, Bang S, Florio FM, Hofling JF. Genetic diversity of competence gene loci in clinical genotypes of *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):3015-20.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013;92(12):1065-73.

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.

Krol E, Wandzik I, Krejmer-Rbalska, Szewczyk B. Biological Evaluation of Uridine Derivatives of 2-Deoxy Sugars as Potential Antiviral Compounds against Influenza A Virus. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8). Pii:E1700.

Lardenois A, Becker E, Walther T, Law MJ, Xie B, Demougin P, et al. Global alterations of the transcriptional landscape during yeast growth and development in the absence of Ume6-dependent chromatin modification. *Mol Genet Genomics*. 2015;290:2031–46.

Leberer E, Ziegelbauer K, Schmidt A, Harcus D, Dignard D, Ash J, et al. Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCl4p. *Curr Biol*. 1997;7:539-46.

Lee JH, Kim YG, Choi P, Ham J, Park, JG, Lee J. Antibiofilm and Antivirulence Activities of 6-Gingerol and 6-Shogaol Against *Candida albicans* Due to Hyphal Inhibition. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:299.

Li Z, Nielsen K. Morphology changes in human fungal pathogens upon interaction with the host. *J. Fungi*. 2017;3, 66.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997;90:939-49. PMID:9298905.

Loeb JD, Sepulveda-Becerra M, Hazan I, Liu H. A G1 cyclin is necessary for maintenance of filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4019-27.

Marcelino FC. Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise [tese]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa;2006.

- Martins HP, Silva MC, Paiva LCF, Estivalet TI, Consolaro MEL. Efficacy of Fluconazole and Nystatin in the Treatment of Vaginal Candida Species. *Acta Derm Venereol.* 2012;92:78-82.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119-28.
- Mishra AK, Choi J, Moon E, Baek KH. Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Mol.* 2018;2;23(4). pii: E815. doi: 10.3390/molecules23040815.
- Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol.* 2003;(3):219-30.
- Monzon O, Yang Yu, Li Q, Alvarez PJJ. Quorum sensing autoinducers enhance biofilm formation and power production in a hypersaline microbial fuel cell. *Biochem Eng J.* 2016;109:222-7.
- Nailis H, Coenye T, Nieuwerburgh FV, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in Candida albicans biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006 Aug 4;7:25.
- Nair M KM, Vasudevan P, Hoagland T, Venkitanarayanan K. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in milk by caprylic acid and monocaprylin. *Food Microbiol.* 2004;21,611e616.
- Nobile CJ, Johnson AD. Candida albicans Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:71-92.
- Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of Candida albicans biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006a;8(9)1382-91.
- Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* 2005;21;15(12):1150-5.
- Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in C. albicans biofilm formation. *Curr Biol.* 2008;18: 1017-24.
- Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan Q T, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* 2006b;2:e63. doi: 10.1371/journal.ppat.0020063
- Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. Systematic screens of a Candida albicans homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet.* 2010;42:590–8.
- Odds FC. Candida and Candidosis. 2^a ed. London: United Kingdom, 1988.

Okasha RM, Albalawi FF, Afifi TH, Fouda AM, Al-Dies AM, El-Agrody AM. Structural Characterization and Antimicrobial Activities of 7H-Benzo[h]chromeno[2,3-d]pyrimidine and 14H-Benzo[h]chromeno[3,2-e][1,2,4]triazolo[1,5-c] pyrimidine Derivatives. *Molecules*. 2016;21(11).pii:E1450.

Ongey EL, Yassi H, Pflugmacher S, Neubauer P. Pharmacological and pharmacokinetic properties of lanthipeptides undergoing clinical studies. *Biotechnol Lett*. 2017;39:473–82.

Orsi CF, Borghi E, Colombari B, Neglia RG, Quaglino D, Ardizzoni A et al. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (HWP1) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. *Microb Pathog*. 2014;9:163-73.

Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S, et al. Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014;28:743-52.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;72:157-65.

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

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida* associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):86-94.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-63.

Pierce CG, Chaturvedi AK, Lazzell AL, Powell A, Saville SP, McHardy S, et al. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. *Biofilms Microbiomes*. 2015;1:15012.

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

Premnath P, Reck M, Wittstein K, Stadler M, Wagner-Dobler. Screening for inhibitors of mutacin synthesis in *Streptococcus mutans* using fluorescent reporter strains. *BMC Microbiology*. 2018;18:24.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005;4:633-38.

Rane HS, Bernardo SM, Howell AB, Lee SA. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:428-36.

Rangnekar SS, Khan T. Novel anti-inflammatory drugs from marine microbes. *Nat Prod J*. 2015;5:206-18.

Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:73–85.

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

Saville SP, Lazzell AL, Bryant AP, Fretzen A, Monreal A, Solberg EO, et al. Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3312–16.

Schroeckh V, Scherlac, K, Nutzmam HW, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuemann J et al. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:14558-63.

Shagaghi N, Palombo EA, Clayton AHA, Bhave M. Archetypal tryptophan-rich antimicrobial peptides: properties and applications. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016;32(2):31.

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

Shaw LM. Advances in cyclosporine pharmacology, measurement, and therapeutic monitoring. *Clin Chem*. 1989; 35:1229-308.

Shekh RM, Roy U. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiology*. 2012;12:132.

Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, Borghi E, Perdoni F, Falleni M, et al. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC Microbiol*. 2014;5;14:182.

Shetty P, Praveen BM, Raghavendra M, Manjunath K, Cheruku S. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel 4-amino-6-(1,3,4-oxadiazolo/1,3,4-thiadiazolo)-pyrimidine derivatives. *Mol Divers*. 2016;2:391-8.

Soliman SM, Elsilk SE. Synthesis, X-ray structure, DFT and antimicrobial studies of Ag(I) complexes with nicotinic acid derivatives. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 2018;187:48-53.

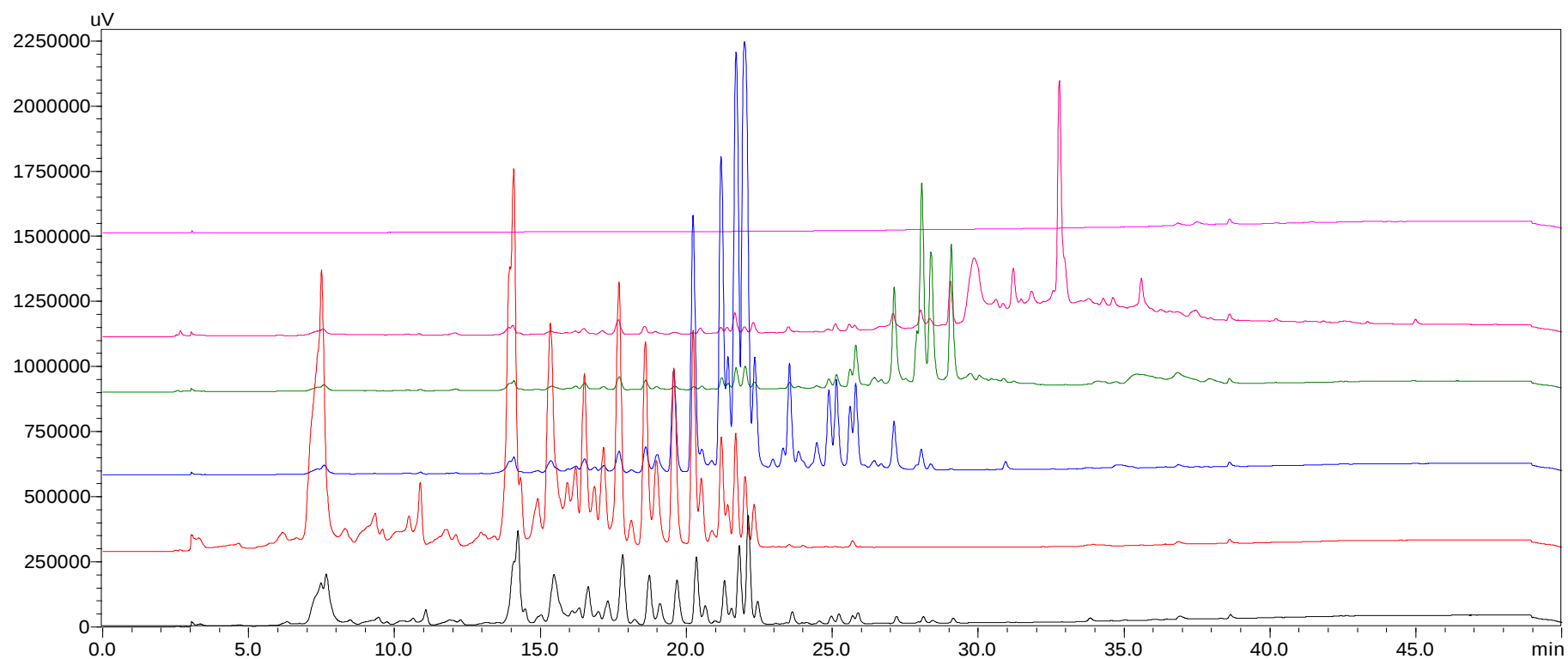
Soto C, Padilla C, Lobos O. Mutacins and bacteriocins like genes in *Streptococcus mutans* isolated from participants with high, moderate, and low salivary count. *Arch Oral Biol*. 2017;(74)1–4.

- Starks CM, Zhou Y, Liu F, Licari PJ. Isolation and characterization of new epothilone analogues from recombinant *Myxococcus xanthus* fermentation. *J Nat Prod.* 2003;66:1313–7.
- Stead P, Rudd B A, Bradshaw H, Noble D, Dawson M J. Induction of phenazine biosynthesis in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* by L-N-(3-oxohexanoyl) homoserine lactone. *FEMS Microbiology Letters.* 1996;140(1):15-22.
- Ström K, Sjörgren J, Broberg A, Schnürer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe–L-Pro) and Cyclo(L-Phe–trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4322-7.
- Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:737-48; PMID:21844880; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2636>.
- Sundstrom P, Balish E, Allen CM. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis.* 2002;(185):521-30.
- Syvitski RT, Tian XL, Sampara K, Salman A, Lee SF, Jakeman DL, et al. Structure-activity analysis of quorum-sensing signaling peptides from *Streptococcus mutans*. 2007;189(4):1441-50.
- Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006;51(8):672-80.
- Tsai PW, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *Bio-Medicine.* 2013;3:51–64.
- Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, French SW, Edwards JE Jr, Filler SG. Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun.* 2000;68:1997-2002.
- Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis.* 2016;74(4):ftw018. doi:10.1093/femspd/ftw018. PMID:26960943.
- Van Delden C, Iglewski B H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):1-13.
- Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 1975;(Tokyo) 28:721–26
- Vílchez R, Lemme A, Ballhausen B, Thiel V, Schulz S, Jansen R, et al. *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *ChemBioChem.* 2010;11(11):1552-62.

- 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.
- Wang S, Wang Q, Yang E, Yan L, Li T, Zhuang H. Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions. *Front Microbiol.* 2017;8:564.
- Wang Y, Dai A, Huang S, Kuo S, Shu M, Tapia CP, et al. Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Beneficial Microbes.* 2014;5(2):161-8.
- Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:529–53.
- Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004;7:350-7.
- Williams JS. Characterization of bioactive secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* and *Prorocentrum* species [thesis]. Wilmington (NC): University of North Carolina Wilmington – UNCW; 2003.
- Xiao J, Moon Y, Li L, Rustchenko E, Wakabayashi H, Zhao X, et al. *Candida albicans* carriage in children with severe early childhood caries (S-ECC) and maternal relatedness. *PloS One.* 2016;11(10): e0164242.
- Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus*–*Candida* interactions in oral health and disease. *Mol Oral Microbiol.* 2014;29(3):99–116.
- Yang L, Chang S, Haoping L. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in Microbiology.* 2014;22(12):707-14.
- Zentek J, Buchheit-Renko S, Ferrara F, Vahjen W, Van Kessel A, Pieper R. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and mediumchain fatty acids in piglets. *Anim. Health Res. Rev.* 2011;12:83e93.
- Zhang K, Ou M, Wang W, Ling J. Effects of quorum sensing on cell viability in *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379:933-8.

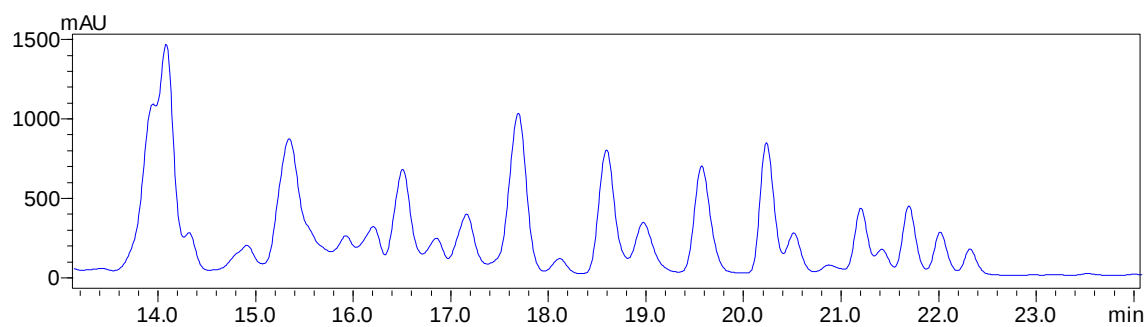
APÊNDICE A – Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) ($\lambda = 220$ nm)

Figura 17 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD das frações SM-EB (preto), SM-F1 (vermelho), SM-F2 (azul), SM-F3 (verde), SM-F4 (rosa), SM-F5 (pink)



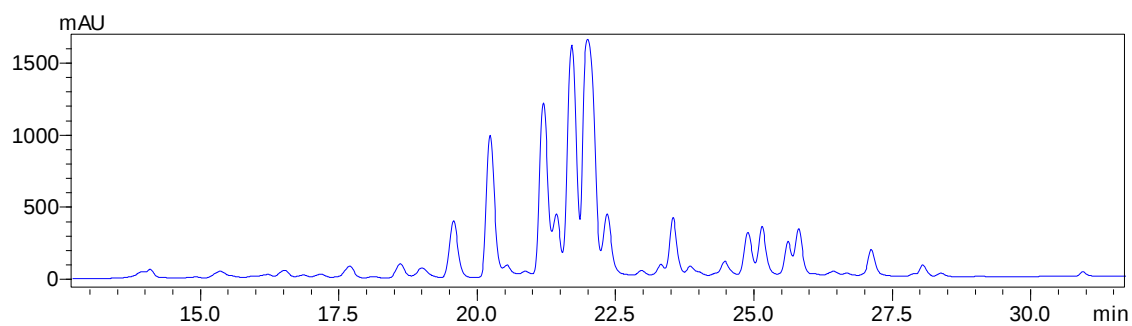
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F1



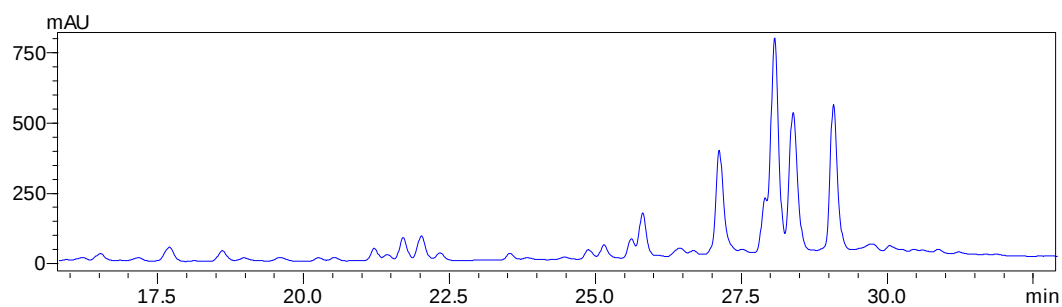
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F2



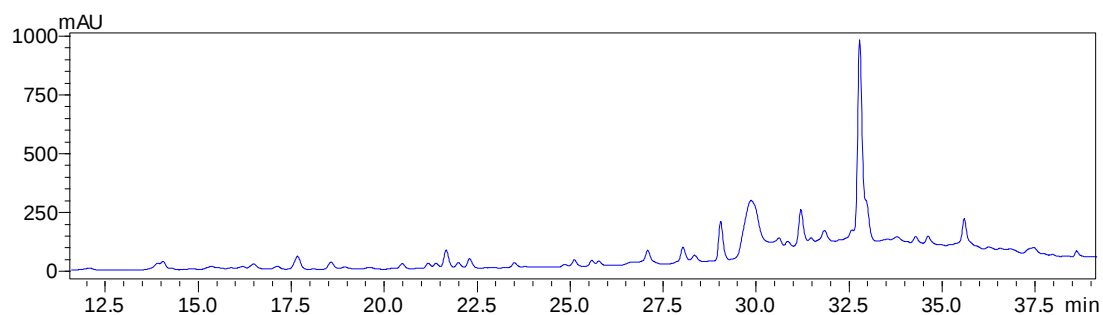
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F3



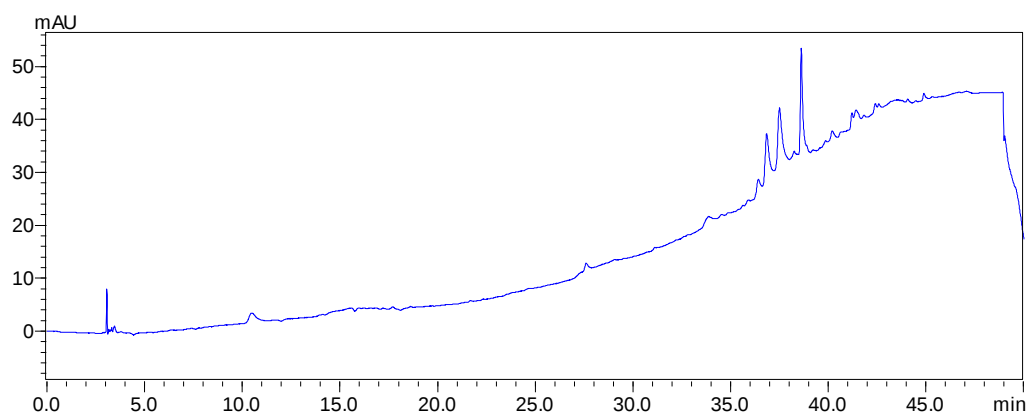
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F4



Fonte: Elaborado pelo autor.

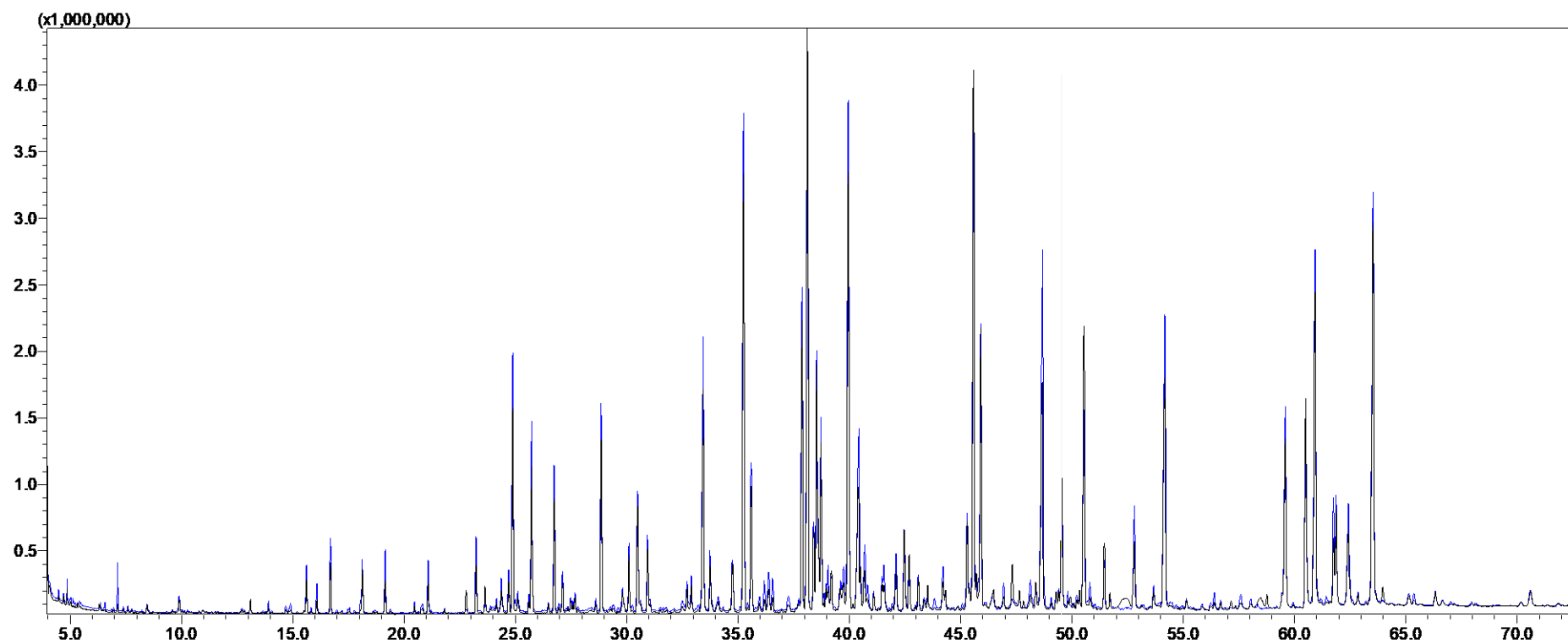
Figura 22 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD, ampliação da fração SM-F5



Fonte: Elaborado pelo autor.

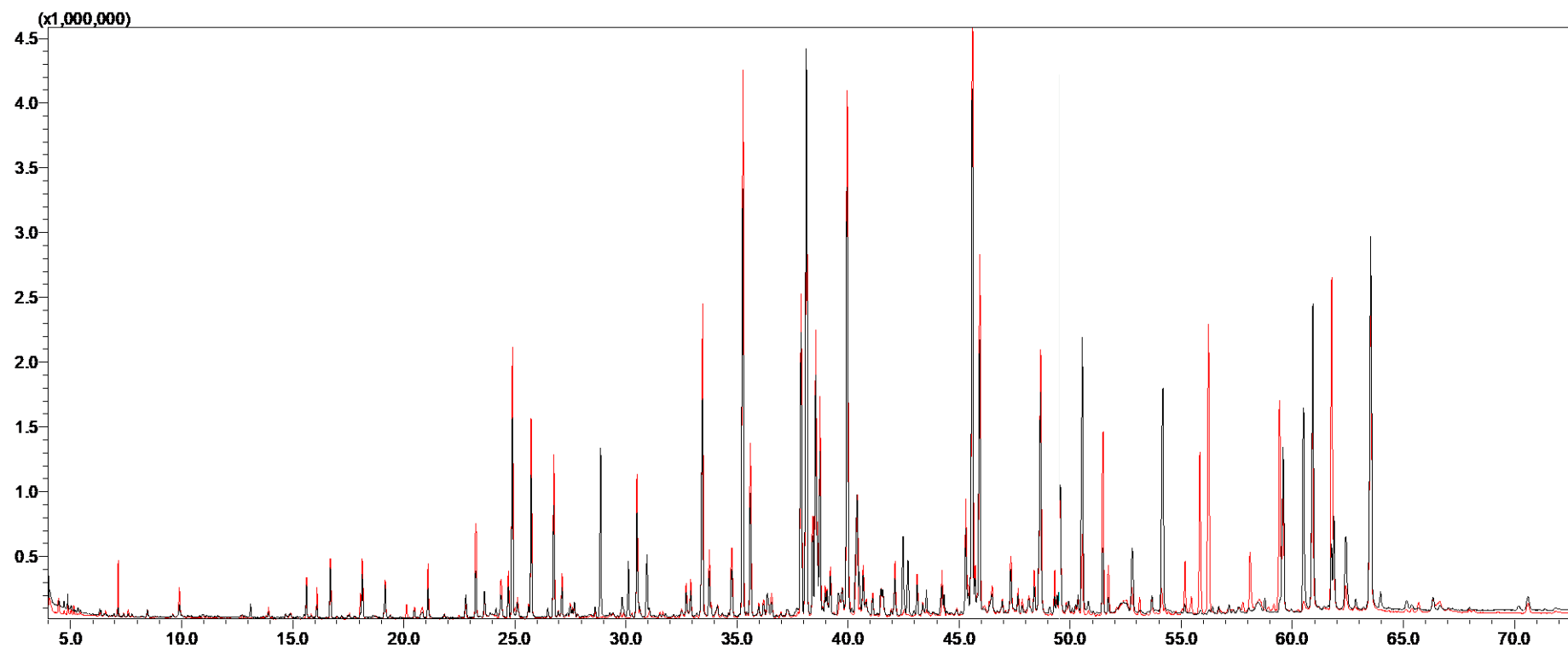
APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Figura 23 - Cromatograma obtido por CG-EM do SM-EB (azul) e controle (preto)



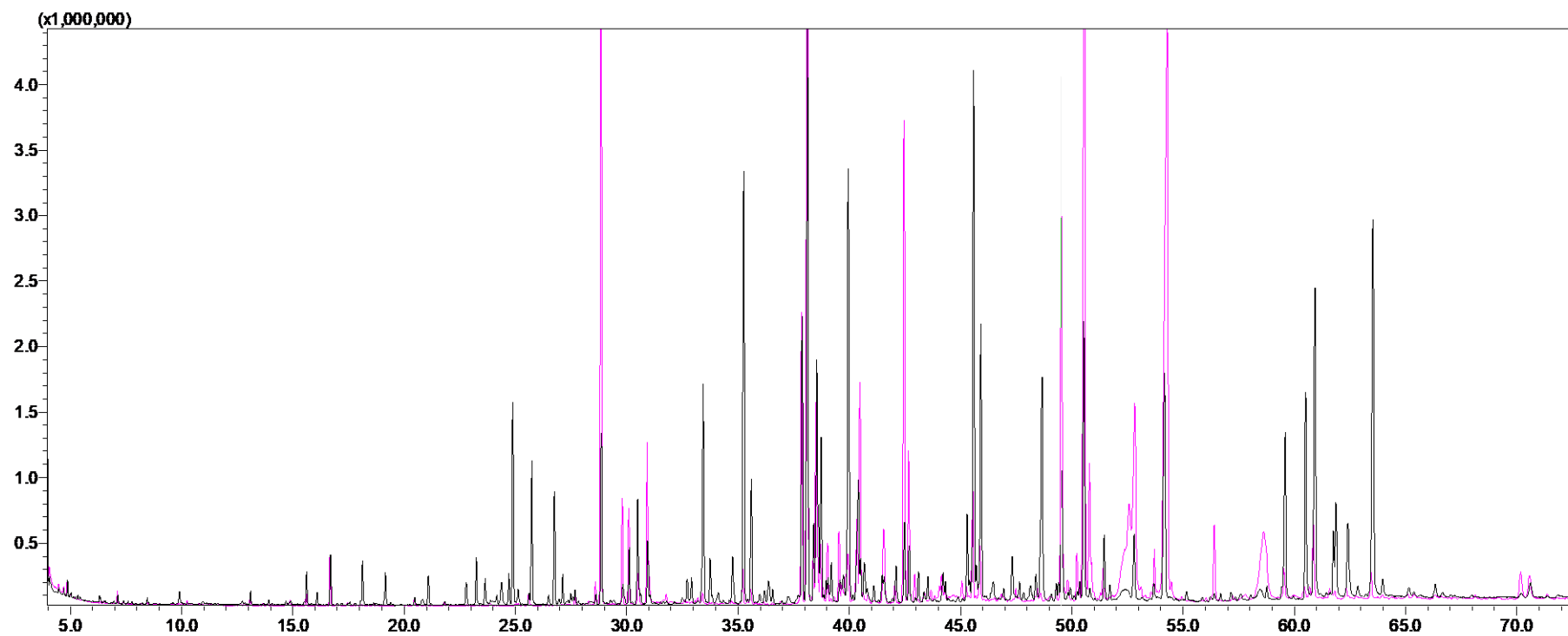
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F1 (vermelho) e controle (preto)



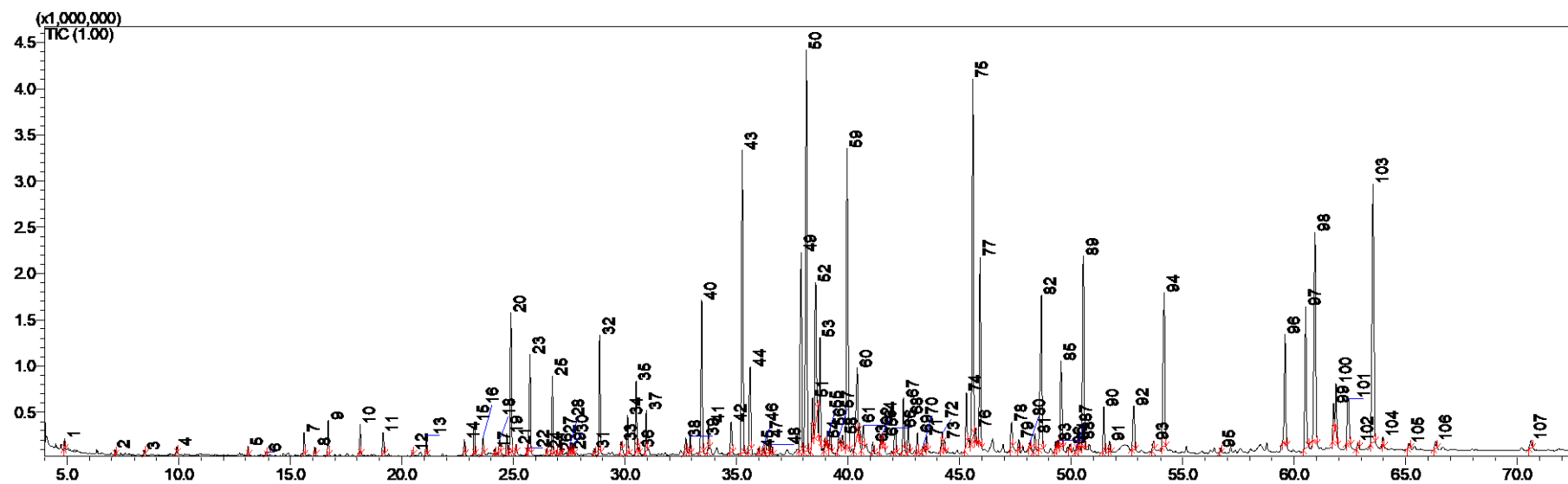
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F2 (rosa) e controle (preto)



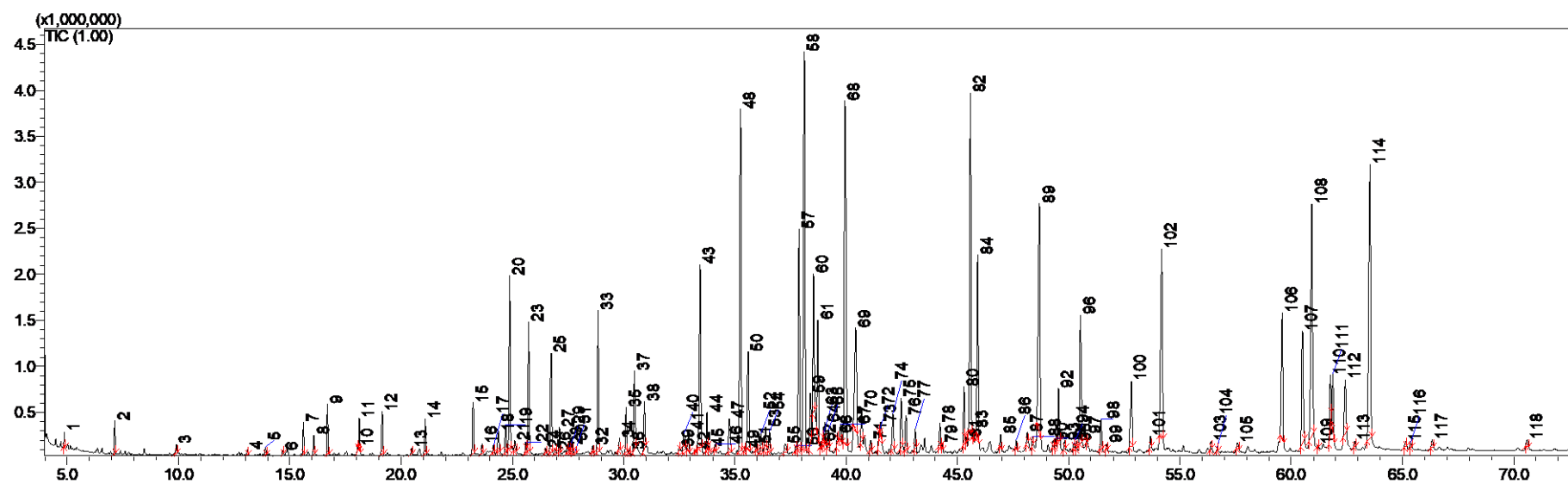
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 - Cromatograma obtido por CG-EM do controle



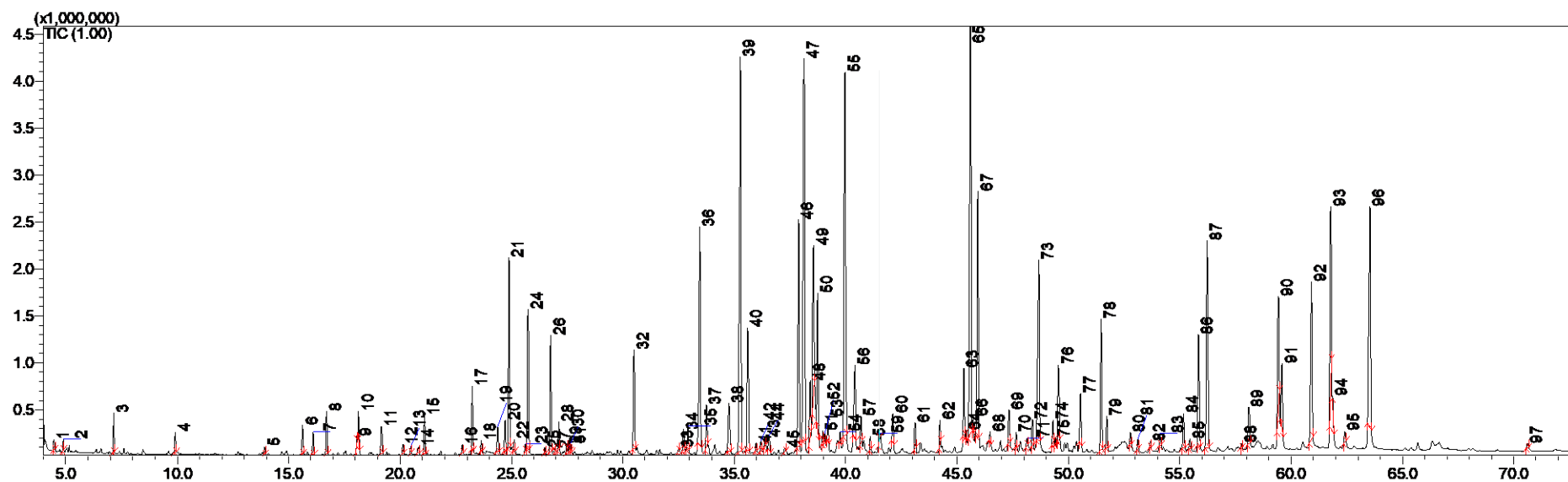
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Cromatograma obtido por CG-EM de SM-EB



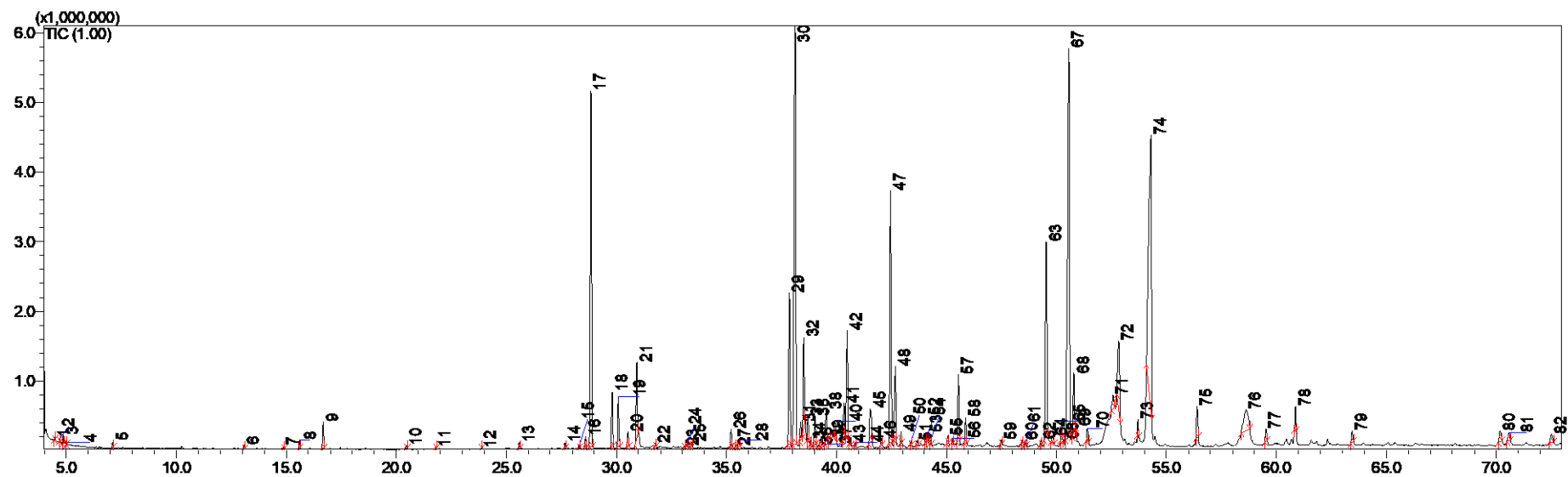
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F1



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F2



Fonte: Elaborado pelo autor.