

RESSALVA

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

14/02/2021



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 Kimpara 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, Lívia Mara Figueiredo, Marisol dos Santos Velloso, Rafaella Braga, Fernanda Freire, Maíra 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 Carvalho 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.

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. *thyrsiflora* 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 *Streptococcus* 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 Rev 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, Marcus 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, Bhavne 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, Elsilik 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.

Figura 31 - Cromatograma obtido por CG-EM da fração SM-F2.
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.