

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Julienne Cristina Passos Nicolau

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DUPLA-ESPÉCIE DE *Candida albicans/Candida krusei*: EFEITO DO VORICONAZOL E DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

**CHARACTERIZATION OF THE DUAL-SPECIES BIOFILM OF *Candida albicans/Candida krusei*: EFFECT OF VORICONAZOLE AND PHOTODYNAMIC ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY**

São José dos Campos, SP

2023

Juliane Cristina Passos Nicolau

**CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DUPLA-ESPÉCIE DE *Candida albicans*/*Candida krusei*: EFEITO DO VORICONAZOL E DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maricilia Silva Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva

São José dos Campos, SP

2023

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Nicolau, Juliene Cristina Passos  
Caracterização do biofilme dupla-espécie de *Candida albicans/Candida krusei* : efeito do voriconazol e da terapia fotodinâmica antimicrobiana / Juliene Cristina Passos Nicolau; orientadora, Maricília Silva Costa; co-orientador Carlos Alberto Silva. - São José dos Campos, SP, 2023.

1 CD-ROM, 73 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

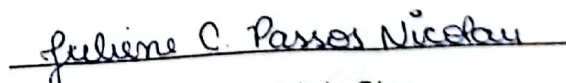
1. Engenharia Biomédica. 2. *Candida albicans*. 3. *Candida krusei*. 4. Biofilmes. 5. Voriconazol. I. Costa, Maricília Silva, orient. II. Silva, Carlos Alberto, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Juliene Cristina Passos Nicolau, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 25 de Janeiro de 2024.

  
Autor(a) da Obra

Data da defesa: 17 / 10 / 23

**JULIENE CRISTINA DA SILVA PASSOS**

**“CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME DUPLA-ESPÉCIE DE Candida albicans/Candida krusei: EFEITO DO VORICONAZOL E DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

Andreza R. Simioni	<i>Andreza R. Simioni</i>
Maricilia S. Costa	<i>Maricilia S. Costa</i>
Renata de A. Canevari	<i>Renata de A. Canevari</i>
Claudia B. L. Campos	<i>Cláudia B. L. de Campos</i>
José A. da S. Junior	<i>José A. S. Junior</i>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 17 de outubro de 2023.

## **DEDICATÓRIA**

À Deus, pois Ele é quem rege a minha vida. Ao meu marido, Me. Gustavo Nicolau de Lima, que segurou minha mão o tempo todo. E aos meus pais, Horacy e Marcia, por me impulsionarem sempre a ser mais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me guiar e me sustentar em todos os momentos, principalmente os mais difíceis. Sem Ele eu nada seria e, possivelmente, não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço ao meu esposo, Me. Gustavo Nicolau de Lima, que foi a minha base até aqui, segurou minha mão e não me deixou desistir nas (inúmeras) vezes que eu quis. Por ter confiado no meu potencial, por me incentivar e apoiar, por enxergar em mim o que eu não conseguia ver. Você é o meu orgulho e eu me inspirei em você muitas vezes para continuar. Obrigada por me fazer ser cada dia melhor. Eu te amo.

Agradeço aos meus pais por terem me educado para ser quem eu me tornei hoje. Por se esforçarem tanto para me proporcionar a educação que eles não tiveram. Por não se cansarem de me ouvir reclamando que “não aguentava mais estudar”, mas seguir entrando em novos cursos e desafios. Por se encherem de orgulho dizendo “minha filha faz doutorado” e compreenderem que eu não estava disponível nos últimos tempos porque eu estava “escrevendo meu TCC”. Mas, principalmente, por terem me amado incondicionalmente.

Sou grata pelo apoio da minha família, em geral, por acreditar no meu futuro e por confiarem sempre no meu potencial. Em especial, minha tia Imaculada, por me escutar desabafando e por ser minha distração no meio do caos; e meu irmão Horacy, por sempre ter sido minha referência de ser humano, de profissional e de aluno, além de me apoiar em todas minhas decisões. Sou grata também à minha nova família que eu ganhei quando casei, que sempre me incentivaram, se orgulharam e vibraram por mim como se cada vitória também fosse deles. Obrigada, principalmente, Fatima e Elierson.

Agradeço às minhas amigas, tanto as que fiz durante a vida acadêmica, quanto aquelas que fiz na vida. Por me aturarem reclamando, por ouvirem sobre os experimentos mais insanos de todos e fingirem que entendiam, por compreenderem quando eu me ausentei, mas principalmente por estarem sempre aqui pra segurar minha mão e vibrarem comigo. Vocês são incríveis: Andreza, Bruna, Lizandra, Melissa e Thamiris. Com ênfase especial para a Dra Bruna Marques, uma irmã que a vida acadêmica me deu e que foi indispensável para o meu desenvolvimento no laboratório e na pesquisa, que me auxiliou de maneira braçal, mas principalmente psicológica. Uma amizade como a sua é rara demais de se encontrar. Obrigada por cada surto juntas, mas também por cada momento memorável que vivemos juntas; desde comer 2 semanas de fast food na UFABC ou quase dormir no laboratório fazendo experimento, a sermos madrinhas de casamento uma da outra.

Agradeço às minhas companheiras de laboratório, que além de me auxiliarem e surtarem comigo às vezes, também fizeram dos horários de almoço os momentos mais engraçados e leves do dia. Obrigada, em especial, Me. Ana Beatriz Furtado Rodrigues (pelos infindáveis áudios divagando no whatsapp e ajudas com artigo mesmo após a sua formação), a futura mestre Gabriela Calvi que topou um intensivão de laboratório comigo e se tornou uma parceira de verdade, minha filha científica Jade, e minhas meninas da geração Z: Qiuxin e Giulia que muitas vezes deram o sangue lavando biofilmes e material ao som da minha terrível playlist (“Canto minha vida com orgulho...”).

Agradeço a UNIVAP/IPD e seus funcionários por toda ajuda e auxílio sempre que precisei; aos professores do programa por todo conhecimento repassado e aos laboratórios parceiros. Agradeço, principalmente, à minha orientadora Dra Maricilia Silva Costa por me ensinar desde o mestrado, não só sobre a carreira acadêmica ou sobre pesquisa, mas também sobre a vida. Afinal, “se fosse fácil não se chamaria vida e, sim, miojo!” HAHAHAHA. Além de tudo, agradeço por confiar em mim e me ajudar a não pirar quando as tribulações apareceram na reta final, definitivamente saber que tinha você comigo me deixou mais calma. Ao meu co-orientador Dr Carlos Alberto-Silva, que mesmo à distância, conseguiu transmitir todo seu carinho, atenção e conhecimento; e que durante os momentos juntos na UFABC foi um grande mentor, e agregou muito valor para a minha pesquisa.

E, por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por investir em mim e confiar no meu potencial durante todos esses anos como bolsista.

“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de formar grandes sofrimentos e também de remedá-los.”

Alvo Dumbledore

## RESUMO

Infecções hospitalares por *Candida spp.* são frequentes e têm aumentado significativamente, apresentando altas taxas de mortalidade em pacientes imunossuprimidos. *Candida albicans* é a espécie mais isolada de infecções na corrente sanguínea, sendo considerada a principal do gênero relacionada às infecções. *Candida krusei* também tem tido notoriedade uma vez que é intrinsecamente resistente ao fluconazol, antifúngico de escolha para os tratamentos de candidemias. Um dos fatores de virulência de *C. albicans* e *C. krusei*, além do dimorfismo, é a capacidade de formar biofilmes. Biofilmes são estruturas complexas com células leveduriformes e filamentosas embebidas em uma matriz extracelular rica em polissacarídeos que dificultam a difusão e ação de drogas, e ação do sistema imunológico do seu hospedeiro. Esses biofilmes são difíceis de erradicar, principalmente quando são polimicrobianos. Os tratamentos com antifúngicos apresentam desafios, uma vez que as espécies fúngicas estão cada vez mais resistentes, devido ao seu uso indiscriminado ou profilático. Além disso, muitas vezes o antifúngico de principal escolha para os tratamentos não funciona para todos os microrganismos das coinfeções. Portanto, a compreensão do comportamento dos biofilmes e das interações entre espécies em biofilmes multiespécies é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento eficazes para as infecções por *Candida spp.* Neste trabalho foi caracterizado o biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* visando compreender as interações entre espécies e a importância de aspectos essenciais para a manutenção do biofilme como: adesão, ordem de adição de espécies, meio de crescimento. Ademais, foi analisado se o meio de cultivo e as interações intra-gênero dos biofilmes mistos alterariam o resultado de uma terapia efetivamente comprovada como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA). Além disso, verificou-se o comportamento de ambas espécies de *Candida*, de maneira isolada e em co-culturas, mediante o uso de um antifúngico alternativo, o Voriconazol (VOR). Aspectos como crescimento, formação de biofilmes e biofilmes em diferentes estágios de maturação foram avaliados. A viabilidade das células planctônicas foi feita por meio da análise da absorbância e os biofilmes foram avaliados quanto a atividade metabólica (XTT), biomassa produzida (coloração com Safranina) e morfologia celular por microscopia óptica. Para identificação das espécies de *Candida spp.* nos biofilmes mistos, foi utilizado o meio de identificação CHROMágar Candida. VOR foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *Candida spp.* e suas co-culturas de modo dose-dependente da concentração celular e do antifúngico, da mesma maneira que também inibiu a viabilidade dos respectivos biofilmes. A caracterização se mostrou de extrema importância, pois esclareceu que ordem de adição de *Candida spp.* à placa de poliestireno, a pré-adesão e o meio em que o biofilme foi formado (RPMI-1640 ou caldo Sabouraud-dextrose) são fatores relevantes a serem considerados no estudo de um biofilme dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei*. Tais fatores podem interferir na composição final desse biofilme e, também, no resultado de um tratamento, como na TFA que inibiu cerca de 40% dos biofilmes maduros mistos formados em RPMI, mas não teve efeito nos biofilmes mistos formados em meio Sabouraud.

**Palavras-Chaves:** *candida albicans*; *candida krusei*; biofilmes multiespécies; caracterização; co-culturas de *Candida spp.*; voriconazol.

## ABSTRACT

Nosocomial infections by *Candida spp.* are frequent and have increased significantly, presenting high mortality rates in immunosuppressed patients. *Candida albicans* is the species most isolated from infections in the bloodstream, being considered the main one of its kind related to infections. *Candida krusei* has also gained notoriety since it is intrinsically resistant to fluconazole, the antifungal of choice for treating candidemia. One of the virulence factors of *C. albicans* and *C. krusei*, in addition to dimorphism, is the ability to form biofilms. Biofilms are complex structures with yeast and filamentous cells embedded in an extracellular matrix rich in polysaccharides that hinder the diffusion and action of drugs, and the action of the host's immune system. These biofilms are difficult to eradicate, mainly when they are polymicrobial. Treatments with antifungals present challenges, as fungal species are increasingly resistant, due to their indiscriminate or prophylactic. In addition, often the main choice of antifungal for treatments does not work for all microorganisms of coinfections. Therefore, understanding biofilm behavior and interspecies interactions in multispecies biofilms is critical to the development of effective prevention and treatment strategies for *Candida spp.* infections. In this work, the dual-species biofilm of *Candida spp.* was characterized in order to understand the interactions between species and the importance of essential aspects for the maintenance of the biofilm such as: adhesion, order of addition of species, growth medium. Furthermore, it was analyzed whether the cultivation medium and intra-genus interactions of mixed biofilms would alter the outcome of an effectively proven therapy such as Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). Also, the behavior of both *Candida* species was verified, in monocultures and co-cultures, using an alternative antifungal, Voriconazole (VOR). Aspects such as growth, biofilm formation and biofilms at different stages of maturation were evaluated. The viability of planktonic cells was assessed by means of absorbance analysis and biofilms were evaluated for metabolic activity (XTT), produced biomass (Safranin staining) and cellular morphology by optical microscopy. To identify the *Candida spp.* in the mixed biofilms, the identification medium CHROMágar Candida was used. VOR was able to significantly inhibit the growth of *Candida spp.* and their cocultures in a dose-dependent manner on cell density and antifungal concentrations, in the same way that it also inhibited the viability of the respective biofilms. The characterization proved to be extremely important, as it clarified the order of addition of *Candida spp.* to the polystyrene plate, pre-adhesion and the medium in which the biofilm was formed (RPMI-1640 or Sabouraud-dextrose broth) are relevant factors to be considered in the study of a dual-species biofilm of *C. albicans* and *C. krusei*. Such factors can interfere in the final composition of this biofilm and also in the result of a treatment, as in PACT, which inhibited around 40% of mature mixed biofilms formed in RPMI, but had no effect on mixed biofilms formed in Sabouraud medium.

**Keywords:** *candida albicans*; *candida krusei*; multispecies biofilms; characterization; *candida spp.* Cocultures; voriconazole.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Lista de patógenos fúngicos prioritários divulgada pela OMS em 2022. ....	16
<b>Figura 2:</b> Esquema simplificado da patogênese de candidíase invasiva.....	17
<b>Figura 3:</b> Relação estrutural entre Fluconazol e Voriconazol. ....	23
<b>Figura 4:</b> Estágios do desenvolvimento de um biofilme. ....	27
<b>Figura 5:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos produzidos em diferentes condições de meio e adesão, identificados em meio CHROMágar Candida. ....	39
<b>Figura 6:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos produzidos em diferentes meios e sob influência da ordem de adesão das espécies, identificados em meio CHROMágar Candida. ....	40
<b>Figura 7:</b> Proporção de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> nas co-culturas sob diferentes meios, identificadas em meioCHROMágar Candida.....	41
<b>Figura 8:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos produzidos em diferentes condições de meio de cultura, na presença de Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida.....	42
<b>Figura 9:</b> Morfologia do biofilme dupla-espécie formado em diferentes condições de meio de cultura. ....	43
<b>Figura 10:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos maduros formados, primariamente, na presença de RPMI-1640, identificados em meio CHROMágar Candida. ....	44
<b>Figura 11:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos maduros formados, primariamente, na presença de Sabouraud-dextrose, identificados em meio CHROMágar Candida....	45
<b>Figura 12:</b> Morfologia do biofilme maduro de duas-espécies em diferentes condições de meio de cultura. ....	46
<b>Figura 13:</b> Efeito da TFA na atividade metabólica de biofilmes dupla-espécie de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> cultivados em meio RPMI ou SB.....	47
<b>Figura 14:</b> Composição dos biofilmes dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> cultivados em meio RPMI ou SB, submetidos à TFA, identificada no meio CHROMágar Candida. ....	48
<b>Figura 15:</b> Efeito da TFA na quantidade de biomassa de biofilmes dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> cultivados em meio RPMI ou SB.....	49
<b>Figura 16:</b> O Voriconazol inibe o crescimento celular de <i>Candida spp.</i> de maneira dependente da concentração, da densidade celular e da composição das co-culturas. ....	51
<b>Figura 17:</b> O Voriconazol inibe a formação de biofilmes de <i>Candida spp.</i> , tanto em culturas isoladas quanto em co-culturas. ....	52
<b>Figura 18:</b> A produção de biomassa de biofilmes de <i>Candida spp.</i> é afetada pela presença de Voriconazol.....	53
<b>Figura 19:</b> O Voriconazol interfere na adesão de <i>Candida spp.</i> à placa de poliestireno.....	54

<b>Figura 20:</b> O Voriconazol tem efeito inibitório sobre o metabolismo de biofilmes maduros de <i>Candida spp.</i> , em culturas isoladas e em co-culturas. ....	55
<b>Figura 21:</b> O Voriconazol afeta a quantidade de biomassa de biofilmes maduros de <i>C. krusei</i> . ....	56
<b>Figura 22:</b> Aspectos morfológicos dos diferentes biofilmes produzidos por <i>C. albicans</i> após tratamento com Voriconazol. ....	58
<b>Figura 23:</b> Aspectos morfológicos dos diferentes biofilmes produzidos por <i>C. krusei</i> após tratamento com Voriconazol. ....	59
<b>Figura 24:</b> Aspectos morfológicos dos diferentes biofilmes produzidos por co-culturas de <i>Candida spp.</i> após tratamento com Voriconazol. ....	60
<b>Figura 25:</b> Identificação de espécies de <i>Candida</i> nas co-culturas iniciais com diferentes proporções. ....	61
<b>Figura 26:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos formados na presença de Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida. ....	62
<b>Figura 27:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes mistos formados após adesão na presença de Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida. ....	63
<b>Figura 28:</b> Quantificação de UFCs de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> em biofilmes maduros mistos submetidos ao Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida. ....	63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Infecções por <i>Candida</i> spp.....	15
2.1.1 <i>Candida albicans</i> .....	18
2.1.2 <i>Candida krusei</i> .....	19
2.2 Antifúngicos.....	20
2.2.1 <i>Voriconazol</i> .....	22
2.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana .....	24
2.4 Biofilmes .....	26
2.4.1 <i>Biofilmes polimicrobianos</i> .....	27
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Caracterização do biofilme dupla-espécie de <i>Candida</i> spp.....	30
4.1.1 <i>Condições de crescimento e meio de cultura</i> .....	30
4.1.2 <i>Identificação de C. albicans e C. krusei em meio CHROMágar Candida</i> .....	30
4.1.3 <i>Viabilidade por meio da atividade mitocondrial utilizando ensaio XTT</i> .....	31
4.1.4 <i>Viabilidade por quantificação da biomassa utilizando ensaio Safranina</i> .....	31
4.1.5 <i>Formação de biofilme dupla-espécie: diferentes métodos de adesão e meios de cultura</i> .....	31
4.1.6 <i>Influência do meio de cultura sobre a formação de biofilme dupla-espécie de Candida spp.</i> .....	33
4.1.7 <i>Influência do meio de cultura sobre o biofilme dupla-espécie maduro de Candida spp.</i> .....	33
4.1.8 <i>Influência do meio de cultura sobre a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em biofilmes dupla-espécie maduros</i> .....	34
4.1.9 <i>Análise qualitativa: morfologia dos biofilmes</i> .....	34
4.1.10 <i>Análise estatística</i> .....	35
4.2 Culturas isoladas de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> e suas co-culturas.....	35
4.2.1 <i>Condições de crescimento de C. albicans e C. krusei e suas co-culturas</i> .....	35
4.2.2 <i>Efeito do Voriconazol sobre o crescimento de Candida spp.</i> .....	35
4.2.3 <i>Efeito do Voriconazol sobre a formação de biofilme de Candida spp.</i> .....	36
4.2.4 <i>Efeito do Voriconazol sobre viabilidade do biofilme maduro de Candida spp.</i> .....	36
4.2.5 <i>Efeito do Voriconazol sobre a adesão à placa de poliestireno de Candida spp.</i> .....	37
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1 Caracterização do biofilme dupla-espécie de <i>C. albicans/C. krusei</i> .....	38
5.1.1 <i>Efeito do meio de cultura, da pré-adesão celular à placa e a interação entre as espécies sobre a composição de biofilmes mistos produzidos por Candida spp.</i> .....	38
5.1.2 <i>Biofilmes mistos de Candida spp. em meio RPMI e SB submetidos ao Voriconazol</i> .....	40

<i>5.1.3 Análise morfológica dos biofilmes mistos formados por Candida spp. sob diferentes meios de cultura</i> .....	42
<i>5.1.4 Influência do meio de cultura sobre biofilmes maduros mistos de Candida spp. submetidos ao Voriconazol</i> .....	43
<i>5.1.5 Análise morfológica dos biofilmes maduros mistos sob diferentes meios de cultura</i> .....	45
<i>5.1.6 Influência do meio de cultura no efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre biofilmes maduros de Candida spp.</i> .....	47
<b>5.2 Culturas isoladas de C. albicans e C. krusei e suas co-culturas</b> .....	49
<i>5.2.1 Efeito do Voriconazol sobre o crescimento de Candida spp.</i> .....	49
<i>5.2.2 Efeito do Voriconazol sobre a formação de biofilme de Candida spp.</i> .....	51
<i>5.2.3 Efeito do Voriconazol sobre a adesão de Candida spp. em superfície de poliestireno</i> .....	53
<i>5.2.4 Efeito do Voriconazol sobre o biofilme maduro de Candida spp.</i> .....	54
<i>5.2.5 Análise morfológica dos biofilmes de Candida spp. submetidos ao Voriconazol</i> ....	56
<i>5.2.6 Identificação das espécies de Candida spp. nas co-culturas submetidas ao Voriconazol</i> .....	61
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas causadas pelos fungos oportunistas do gênero *Candida* têm sido relatadas com frequência, especialmente em âmbito hospitalar (cerca de 80%), onde são encontradas em pacientes imunocomprometidos, transplantados ou que fazem uso de dispositivos médicos implantados (próteses, sondas e cateteres, por exemplo). Essas doenças podem se manifestar de diferentes maneiras, desde infecções superficiais e nas mucosas à candidemias (quando atingem a corrente sanguínea). Uma vez que esse fungo existe na microbiota humana de forma não patogênica, é alarmante a alta taxa de mortalidade e morbidade relacionado a ele (Pfaller; Diekema, 2007; Martins *et al.*, 2014; Dancini; Santos; Fukuchi, 2020).

Ademais, o gênero *Candida* é um fungo dimórfico capaz de transitar da sua forma leveduriforme para sua forma filamentosa, etapa essencial para a formação de biofilmes, sendo um aspecto fundamental para a virulência e colonização do fungo. Os biofilmes, por sua complexa e estruturada comunidade microbiana embebidos em matriz extracelular (MEC), são difíceis de erradicar, especialmente devido à sua elevada resistência antifúngica e impedimento de ação do sistema imune do hospedeiro (Seneviratne; Samaranayake, 2008; Martins *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2020). Além disso, a sua capacidade de colonizar e formar essas estruturas complexas tanto em superfícies bióticas como abióticas, sugere que este seja o fator de virulência mais relevante de *Candida*, tornando-se um grande desafio clínico.

É natural a coexistência de microrganismos em um sistema (biota). A microbiota, por exemplo, nunca é formada por apenas uma espécie fúngica e/ou bacteriana. Estruturas complexas e resistentes compostas por mais de um organismo, conhecidas como biofilmes multiespécies, podem ocorrer com interação de bactéria-fungo e, também, entre fungos ou entre bactérias (Lohse *et al.*, 2018; Ponde *et al.*, 2021). Biofilmes polimicrobianos podem dificultar a identificação do agente etiológico da doença e, assim, dificultar o tratamento de escolha para tal (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019). Ademais, a composição do biofilme pode influenciar na quantidade de dispersão do mesmo, o que sugere que biofilmes mistos geram competição entre as espécies ali presentes e que uma delas sempre sobressai à outra. Com o fungo do gênero *Candida* não é diferente, principalmente entre espécies do mesmo gênero que podem formar biofilmes ainda mais resistentes quando estão associadas, devido ao efeito sinérgico de seus fatores de resistência (Ponde *et al.*, 2021).

Dentre as espécies do gênero, *Candida albicans* tem se destacado nos casos. Pode apresentar resistência aos antifúngicos convencionais, especialmente em casos em que a doença

é crônica ou recorrente. Outra espécie não-*albicans* (NAC) que tem tido notoriedade é *Candida krusei*; intrinsecamente resistente ao fluconazol e a algumas outras classes de antifúngicos comumente utilizados (Samaranayake; Samaranayake 1994; Orozco *et al.*, 1998; Espinel-Ingroff *et al.*, 2014; Sanguinetti; Posteraro; Lass-Flörl, 2015). Apesar da ocorrência em menos de 50% dos casos de candidemias, *C. krusei* também apresenta riscos ascendentes de casos graves e/ou fatais com taxas de 44–67 % de mortalidade (Gómez-Gaviria; Mora-Montes, 2020; World Health Organization, 2022). Embora haja extensa descrição de biofilmes mistos entre *C. albicans* e bactérias (Harriott; Noverr, 2009; 2011; Harriott *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2018; Carolus; Van Dyck; Van Dijck, 2019), as interações intra-gênero ainda são escassamente descritas. Por conta disso, torna-se interessante estudar o comportamento de espécies de *Candida* de maneira isolada e em uma co-cultura de *C. albicans* e não-*albicans*.

A resistência aos antifúngicos, uma preocupação cada vez mais alarmante na prática clínica, tem limitado consideravelmente as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de Candidemias. Nesse cenário, a busca por terapias alternativas e mais eficazes tornou-se imperativa. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) surgiu como uma abordagem promissora, demonstrando potencial na inativação de *Candida*, inclusive em biofilmes. No entanto, a caracterização detalhada e a compreensão dos biofilmes polimicrobianos, nos quais espécies de *Candida* coexistem com outras bactérias ou fungos, permanecem desafiadoras e essenciais para a otimização das estratégias terapêuticas. Diante deste cenário, o intuito deste trabalho visa a compreensão dinâmica dos biofilmes polimicrobianos de *C. albicans* e *C. krusei*, proporcionando perspectivas fundamentais para o desenvolvimento de terapias direcionadas e mais eficazes no enfrentamento das infecções por *Candida*, bem como o estudo da resposta de ambas espécies ao efeito de um antifúngico alternativo, o Voriconazol, sob diferentes aspectos do fungo (forma planctônica, biofilmes jovens e maduros).

Os resultados deste trabalho podem auxiliar na escolha para o uso de um antifúngico não recorrente para infecções por *Candida spp.*, bem como contribuir para o meio científico ao fornecer dados sobre biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei* e fatores importantes que podem implicar nos resultados de terapias antimicrobianas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecções por *Candida* spp.

As doenças fúngicas matam mais de 1,5 milhão e afetam mais de um bilhão de pessoas. Contudo, ainda são um assunto negligenciado na área da saúde pública, mesmo que a maioria das mortes por doenças fúngicas seja evitável (Bongomin *et al.*, 2017; World Health Organization, 2022).

Infecções por *Candida* são um grave problema de saúde pública. As infecções hospitalares causadas por *Candida* spp. estão se tornando cada vez mais comuns e representam mais de 85 % de todas as infecções fúngicas invasivas na Europa e nos Estados Unidos (Sharma *et al.*, 2019). Em países em desenvolvimento e em países desenvolvidos, além de mais prevalentes, essas infecções são acompanhadas por taxas de mortalidade perigosamente altas (Sharma *et al.*, 2019). No ano de 2016 no Brasil foi registrada uma taxa de mortalidade de 72,2 % relacionada à candidemias (Doi *et al.*, 2016; ROSA, 2021; Sharma *et al.*, 2019), enquanto o Reino Unido apresentou taxas superiores a 40 % (Bongomin *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2019). Agnelli *et al.* (2023) observaram que após 14 e 30 dias da infecção por *Candida*, houve uma taxa de mortalidade de 35 e 50 %, respectivamente, em um estudo que analisou mais de 600 casos em hospitais do Brasil.



















A mortalidade de pacientes com candidíase invasiva pode atingir taxas de mais de 40 % (Pfaller; Diekema, 2007). A candidíase está geralmente associada ao uso de dispositivos médicos internos (por exemplo, implantes dentários, cateteres, válvulas cardíacas, enxertos vasculares, lentes oculares e articulações artificiais), que podem atuar como substratos para o crescimento do biofilme (Chandra *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2014). De fato, devido às altas taxas de internações durante a pandemia de coronavírus (COVID-19) e o uso de dispositivos médicos (como tubos) nas internações, houve um aumento dos casos de infecções fúngicas, entre elas infecções por *Candida* spp., em pacientes hospitalizados em razão do COVID-19 (MORAes; Felix; BaDIN, 2022; World Health Organization, 2022).

Das várias espécies de *Candida*, mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* (Colombo; Almeida Júnior; Guinea, 2017; Jamiu *et al.*, 2021). As manifestações clínicas variam de supercrescimento nas mucosas a infecções disseminadas como candidemias. Fatores

de virulência como adesão tecidual, fenótipo a comutação e a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares são responsáveis pela colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro, juntamente com fatores do hospedeiro, como estados imunocomprometidos (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016; Zarnowski *et al.*, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization* – OMS) divulgou um relatório em 2022 reportando uma lista de fungos responsáveis por infecções que representam a maior ameaça à saúde pública mundial, chamada *Fungal Priority Pathogens List* (FPPL – em português lista de patógenos fúngicos prioritários). O intuito desta lista é orientar a pesquisa, o desenvolvimento e as ações de saúde pública no tratamento dessas infecções fúngicas. Tal lista foi elaborada levando em consideração critérios como: significado clínico, gravidade das doenças que causam, disponibilidade de tratamentos eficazes e potencial para futuros surtos. Dentre as espécies que aparecem na FPPL, estão *C. albicans* e *C. krusei*, além de outras três espécies de *Candida* (Figura 1) (World Health Organization, 2022).

**Figura 1:** Lista de patógenos fúngicos prioritários divulgada pela OMS em 2022.

Critical group	High group	Medium group
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> ( <i>Candida glabrata</i> )	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>Candida krusei</i> )
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

**Legenda:** Lista de 19 patógenos classificados pela OMS em três grupos prioritários segundo critérios relacionados à resistência antifúngica, mortalidade, tratamento, acesso a diagnósticos incidência anual e complicações e sequelas. Em ordem de prioridade: *critical group*, *high group* e *medium group*. Destaques em amarelo para *Candida spp.*

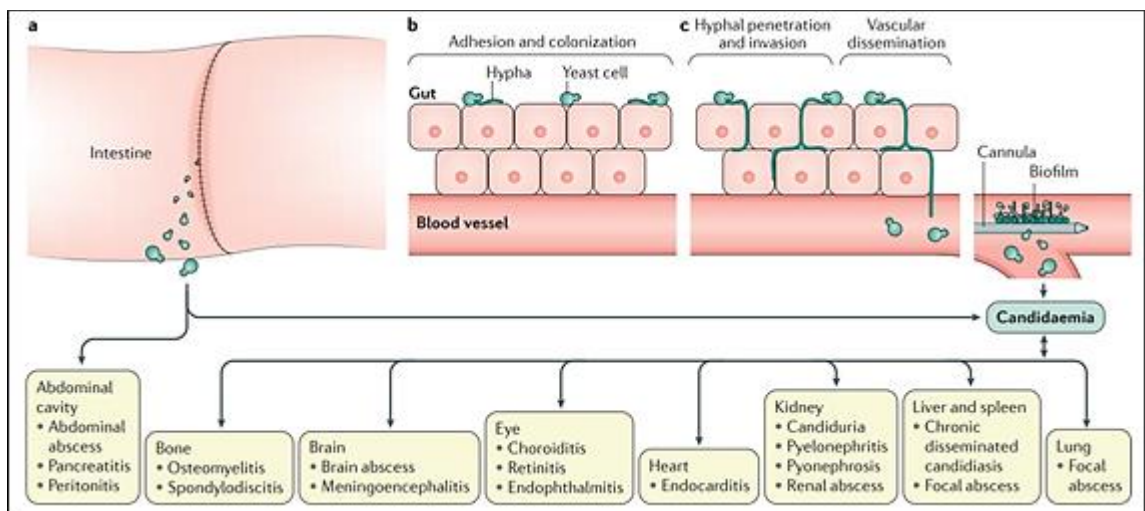
**Fonte:** Adaptado de World Health Organization, 2022.

Os antifúngicos mais utilizados para tratamento de infecções nosocomiais são da classe dos azóis. Entretanto, o uso do fluconazol de modo empírico ou profilático são algumas das

possíveis causas para resistência fúngica, especialmente da espécie emergente *C. krusei* (Orozco *et al.*, 1998; Gómez-Gaviria; Mora-Montes, 2020; Yang *et al.*, 2022).

As leveduras do gênero *Candida* são normalmente inofensivas, com seu crescimento controlado pela microbiota coexistente, barreiras epiteliais intactas e defesas do sistema imune inato (a primeira defesa do organismo que serve para barrar o avanço de “invasores”) (Maza *et al.*, 2017). Entretanto, sua patogenicidade se dá devido ao oportunismo, pois pode causar infecções leves a graves em um organismo com alguma dessas barreiras debilitada ou defasada. O uso prolongado de antibioticoterapias, por exemplo, reduz a presença de bactérias que controlam o crescimento de *Candida spp.* na microbiota, permitindo que esta cresça exacerbadamente e cause candidíase (Pfaller; Diekema, 2007; Pappas *et al.*, 2015; Wall *et al.*, 2019; Dacini; Santos; Fukuchi, 2020; Yang *et al.*, 2022).

**Figura 2:** Esquema simplificado da patogênese de candidíase invasiva.



**Legenda:** Esquemática do processo de infecção por *Candida spp.* onde (a) o fungo consegue ultrapassar a barreira natural onde vive e alcança a cavidade abdominal e a corrente sanguínea [Candidemia]. O fungo vivendo na microbiota (b), quando começa a se disseminar e alcança locais [até então inacessíveis] devido ao rompimento pelo uso de algum instrumento externo (c) e alcança a corrente sanguínea [Candidemia].

**Fonte:** Adaptado de Pappas *et al.*, 2018.

A capacidade de formar biofilmes pode induzir uma redução significativa na suscetibilidade antifúngica de leveduras e um aumento em sua capacidade de evadir o sistema imunológico (Pulcrano *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2018).

### 2.1.1 *Candida albicans*

O fungo *C. albicans* é polimórfico, podendo apresentar leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras. Sua habilidade de morfogênese é considerada um dos aspectos mais importantes de sua virulência, pois assim consegue se adaptar a condições adversas de meio, aderir aos mais diversos substratos, invadir os tecidos do hospedeiro e causar infecções e evadir da ação do sistema imune (Poulain, 2015; Nobile; Johnson, 2015; Maza *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2017; 2020).

As células leveduriformes podem ser também chamadas de blastoconídios que se reproduzem por brotamento, são ovóides quase esféricas, variando em tamanho de 2-3 µm por 4-6 µm (Odds; Kerriage, 1985; Oliveira; Cortez; Souza, 2014). Suas hifas alongam continuamente e são células quase perfeitamente cilíndricas. Já as pseudohifas são essencialmente células blastoconidiais, alongadas que dão uma aparência de uma cadeia celular filamentosa que muitas vezes é estreita o suficiente para ser confundida com uma hifa verdadeira (Odds; Kerriage, 1985).

Além das estruturas básicas apresentadas por *C. albicans* (leveduras e hifas), também pode formar clamidospóros em condições adversas. A formação de clamidospóros em condições específicas é uma das formas mais eficazes de distinguir *C. albicans* de seu parente próximo, *C. dubliniensis* (Odds; Kerridge, 1985; Sonneborn; Bockmühl; Ernst, 1999; Whiteway; Bachewich, 2007). Outro método importante para sua diferenciação é utilizando o meio CHROMágar Candida, em que *C. albicans* aparece como uma colônia pequena e verde, com aspecto brilhante e cremoso (Odds; Bernaerts, 1994).

A espécie fúngica *C. albicans* é a mais prevalente da microbiota humana; está presente em muitas áreas do corpo, particularmente nas mucosas dos tratos gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis vivendo como comensal (Odds, 1987; Nobile; Johnson, 2015).

Embora várias espécies de *Candida* tenham emergido como patógenos importantes, *C. albicans* continua sendo a espécie mais isolada, dotada de uma ampla lista de fatores de virulência e características comensais que conferem a capacidade de colonizar e invadir o tecido do hospedeiro (Chandra *et al.*, 2001; Nobile; Johnson, 2015). Entre esses fatores podemos citar: a expressão de adesinas na superfície celular, dimorfismo, secreção de enzimas hidrolíticas e formação de biofilmes (Douglas, 2003; Barros *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de biofilme, a resistência a antifúngicos e interações polimicrobianas têm sido os focos de pesquisas sobre biofilme de *C. albicans* e, embora haja avanços recentes sobre a formação de biofilmes de espécies únicas e mistas, ainda há muito a ser descoberto (Ponde *et al.*, 2021).

### 2.1.2 *Candida krusei*

*Candida krusei* é um fungo dimórfico que geralmente existe como leveduras unicelulares ou pseudohifas. As duas formas morfológicas podem estar presentes ao mesmo tempo, em culturas de crescimento, mas são difíceis de encontrar separadas. Sua reprodução assexuada acontece por brotamento (Samaranayake; Samaranayake, 1994). Diferentemente da maioria dos membros do gênero, as células de *C. krusei* são alongadas (ovaladas) e assemelham-se a longos grãos de arroz com dimensão de 2,2–5,6 µm por 4,3–15,2 µm (Parahitiyawa *et al.*, 2006; Jamiu *et al.*, 2021). Em meio CHROMágar Candida, *C. krusei* aparece como uma colônia rosa-claro, com bordas esbranquiçadas e textura áspera (Jamiu *et al.*, 2021). Essa espécie também forma uma película ou filme aderente na superfície de cultura líquida, especialmente caldo Sabouraud-dextrose, e esta característica a distingue das demais espécies patogênicas de *Candida* (Fleischmann; Sripuntanagoon, 2011; Jamiu *et al.*, 2021).

A espécie *C. krusei* tem tido notoriedade no ambiente médico devido à sua resistência intrínseca ao antifúngico fluconazol e baixa susceptibilidade a outras classes antifúngicas. Além disso, nos últimos anos, essa espécie demonstrou a capacidade de se tornar resistente aos diversos fármacos de escolha para tratamentos de infecções fúngicas (Gómez-Gaviria; Mora-Montes, 2020).

É um fungo isolado, principalmente, em casos de infecções graves em pacientes neutropênicos que apresentam sistema imune debilitado, em especial, pacientes oncológicos (que passaram por quimio e/ou radioterapia), portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), portadores de neoplasias hematológicas, transplantados, e pacientes acometidos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (Samaranayake; Samaranayake, 1994; Wu *et al.*, 2017). *Candida krusei* pode causar lesões superficiais nas mucosas e casos leves de candidíase, mas é encontrada, principalmente, em casos graves de infecções em corrente sanguínea (candidemias), que podem acometer profundamente outros órgãos e vísceras e levar o infectado ao óbito (Jamiu *et al.*, 2021).

Apesar de ser uma espécie que aparece em 2,8 % dos isolados clínicos, *C. krusei* apresenta alta taxa de mortalidade (aproximadamente 58 %) em pacientes acometidos por candidemias (Klingspor *et al.*, 2015).

## 2.2 Antifúngicos

Atualmente existem vários tipos de antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas. As principais classes são: os azóis, os polienos, as equinocandinas e as pirimidinas, e cada um tem um mecanismo de ação na célula-alvo. Cada composto antifúngico tem vantagens e limitações relacionadas ao seu espectro de atividade e modo de ação (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011; Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). A escolha do antifúngico dependerá do tipo de infecção fúngica e da gravidade da doença. É importante lembrar que o uso indiscriminado de antifúngicos pode levar ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos e a outras complicações. De maneira geral, os antifúngicos podem apresentar efeitos colaterais diversos, de grau moderado à grave. Por isso tem surgido tantos estudos de tratamentos alternativos para infecções fúngicas, uma vez que os casos mais graves de fungemias acometem pessoas que já estão altamente debilitadas.

Atualmente os antifúngicos mais utilizados contra infecções por *Candida spp.* são anfotericina B e as equinocandinas. Em especial, o uso de antifúngicos da classe de equinocandinas foi intensificado (de 13 para 41 %), e as anidulafunginas têm sido tratamento de escolha devido à sua baixa interação farmacológica (Agnelli *et al.*, 2023).

Os polienos se ligam à membrana celular dos fungos, causando a sua ruptura e morte. Ligam-se ao ergosterol nas membranas das células fúngicas formando poros transmembrana, que resultam em perda da integridade da membrana e interrupção do gradiente iônico (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). A anfotericina B é um exemplo de polieno e é normalmente usada para tratar infecções fúngicas graves, como a candidíase invasiva e a aspergilose, entretanto seu uso é restrito ao âmbito hospitalar. Apesar de apresentar bons resultados contra os patógenos, um dos principais efeitos adversos dos polienos é a nefrotoxicidade (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011).

As equinocandinas atuam inibindo a síntese da parede celular dos fungos por meio da inibição da  $\beta$ -1,3-glucana sintase. Um exemplo muito utilizado desta classe é a Caspofungina

(Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). São o tratamento de escolha para infecções graves por *Candida*, mas também podem ser utilizadas para tratar aspergiloses combinadas com outros fármacos, devido ao seu efeito fungistático em *Aspergillus*. Têm sido relatados casos de hepatite e erupções cutâneas decorrentes do uso prolongado desta classe de antifúngicos, mesmo que esse fármaco tenha como alvo um componente específico de fungos que não é conservado em células de mamíferos (Shapiro; Robbins; Cowen, 2011).

As pirimidinas interferem na síntese do DNA dos fungos, inibindo a síntese de DNA e RNA das células fúngicas (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). A flucitosina é um exemplo de pirimidina e é frequentemente usada em combinação com outros antifúngicos para tratar infecções fúngicas. Os efeitos colaterais relacionados a elas são: supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e enterocolite.

Os azóis atuam inibindo a síntese do ergosterol, um componente importante da membrana celular dos fungos, por meio da inibição de lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). São considerados de amplo espectro já que são usados para tratar várias infecções fúngicas, incluindo candidíase, aspergilose e dermatofitose. O uso prolongado desses fármacos pode ter consequências adversas que incluem, principalmente, hepatotoxicidade (Bongomin *et al.*, 2017). Podem ser divididos em imidazóis ou triazóis, e se diferenciam apenas pela quantidade de átomos de nitrogênio e carbono na estrutura molecular (Moraes; Felix; Badin, 2022). Os derivados de imidazóis (cetoconazol, por exemplo) inibem enzimas ligadas à membrana e a biossíntese de lipídios da membrana, podendo afetar as membranas diretamente pela ligação aos lipídios. Enquanto os derivados triazólicos mais recentes, como fluconazol e itraconazol, devem sua atividade antifúngica exclusivamente à inibição da esterol 14 $\alpha$ -desmetilase dependente do citocromo P-450 (Moraes; Felix; Badin, 2022; Sanati *et al.*, 1997).

A resistência microbiana aos antifúngicos está relacionada com mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida (Arthington-Skaggs; Rex, 2008; Vieira; Santos, 2017). A resistência intrínseca, como a de *C. krusei* ao fluconazol, ocorre sem que haja a exposição do micro-organismo à droga, de maneira inata e fenotípica. Os mecanismos de resistência adquirida podem envolver diversos fatores, entre eles a reprodução assexuada e altas taxas de mutação (Vieira; Santos, 2017).

A superexpressão de bombas de efluxo são um dos principais mecanismos de resistência de *Candida spp.*, na qual há a retirada da droga do interior da célula e, por esta razão, a ação e a concentração do antifúngico é alterada (Arthington-Skaggs; Rex, 2008; Vieira; Santos, 2017).

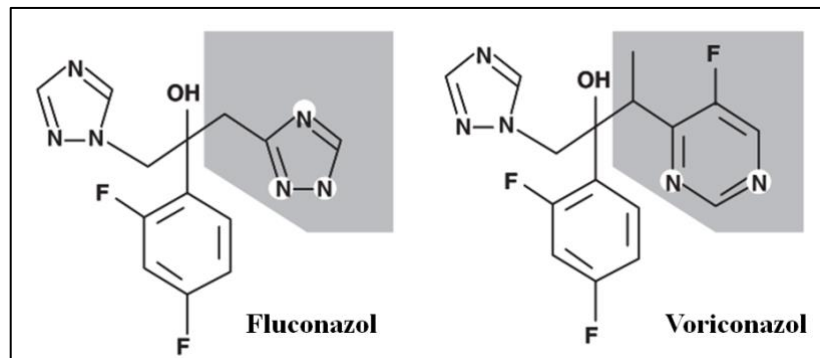
As mutações genéticas também são uma das causas conhecidas, por exemplo o gene ERG11 que pode levar a alteração do sítio de ligação de algumas drogas (azóis) e diminuir ou mudar a sua afinidade. É necessário adotar algumas medidas, como uso de dosagens adequadas e detecção da espécie causadora da infecção para tratamento assertivo, a fim de reduzir ou combater o aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos (Arthington-Skaggs; Rex, 2008; Silva *et al.*, 2021a; Vieira; Santos, 2017).

### 2.2.1 Voriconazol

Voriconazol é um agente antifúngico triazol, da classe dos azóis, que surgiu no início dos anos 2000 como uma boa alternativa para tratamentos antifúngicos devido à sua, até então, não toxicidade e seu uso tanto oral quanto intravenoso. Estudos de casos demonstraram que VOR foi eficaz, inclusive, contra espécies do gênero *Aspergillus*, resistentes à anfotericina B. Contudo, sua ação é fungistática, assim como outros azóis, em fungos do gênero *Candida*. Apesar disso, tem se mostrado eficaz contra esse gênero, até mesmo em espécies intrinsecamente resistentes ao fluconazol, como *C. krusei* (Manavathu; Cutright; Chandrasekar, 1998; Johnson; Kauffman, 2003; Donnelly; Pauw, 2004; Pfaller *et al.*, 2011; Malani; Kerr; Kauffman, 2015).

O Voriconazol é um agente antifúngico triazólico ativo contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Scedosporium apiospermum* e outros patógenos menos comuns. Foi desenvolvido com a finalidade de potencializar e aumentar o espectro de ação do fluconazol; são quimicamente semelhantes, exceto pela adição de um grupo  $\alpha$ -metila e uma estrutura 4-fluoropirimidina em substituição de um anel triazol (Figura 3) (Araújo, 2008; Moraes; Felix; Badin, 2022; Sanati *et al.*, 1997).

**Figura 3:** Relação estrutural entre Fluconazol e Voriconazol.



**Legenda:** Estrutura química dos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol, que são quimicamente semelhantes, exceto (em evidência) pela adição de um grupo  $\alpha$ -metila e uma estrutura 4-fluoropirimidina (no Voriconazol) em substituição de um anel triazol (no Fluconazol).

**Fonte:** Adaptado de Donnelly e Pauw, 2004.

A atividade *in vitro* do Voriconazol contra *Candida spp.* não é uniforme. As espécies mais frequentemente envolvidas em infecções (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*) geralmente exibem Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de VOR de menos de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . No entanto, para isolados resistentes ao fluconazol as CIMs são mais altas do que as dos isolados susceptíveis ao fluconazol. Logo, toda tentativa de identificar espécies de *Candida* deve ser feita para tratar corretamente os casos de Candidíases.

Estudos iniciais ao surgimento do fármaco, indicaram que o Voriconazol era mais eficaz do que o fluconazol no bloqueio da biossíntese de esteróis de *Candida spp.*, consistente com as diferentes potências antifúngicas desses compostos (Sanati *et al.*, 1997). Ainda assim, VOR é utilizado apenas como um agente antifúngico alternativo para doenças causadas por leveduras, sendo escolhido preferencialmente contra fungos “tipo bolor”, como *Aspergillus*. Apesar de demonstrar eficácia contra alguns tipos de candidíases, VOR não é o tratamento de escolha e, sim, selecionado apenas contra espécies resistentes ao fluconazol (Ally *et al.*, 2001; Pappas *et al.*, 2009; Cornely *et al.*, 2012; Malani; Kerr; Kauffman, 2015).

Como todo antifúngico, Voriconazol possui alguns efeitos adversos devido ao seu uso prolongado que pode incluir periostite, alopecia e desenvolvimento de câncer de pele (Malani; Kerr; Kauffman, 2015). Apesar de ser um componente antifúngico importante no combate às infecções fúngicas, o uso de VOR requer medição das concentrações séricas e monitoramento rigoroso dos seus efeitos colaterais (Malani; Kerr; Kauffman, 2015).

### 2.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Devido às limitações dos tratamentos existentes, têm sido intensamente exploradas alternativas antimicrobianas, e dentro desse contexto, um método alternativo para desativar patógenos microbianos (Trigo-Gutierrez *et al.*, 2018). A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) como terapia antifúngica tem sido demonstrada por diferentes autores (Maisch, 2007; Perussi, 2007; Wainwright, 1998; Wiench *et al.*, 2021<sup>a</sup>; 2021<sup>b</sup>). Resumidamente, a terapia fotodinâmica combina o uso de um agente fotossensível/fotossensibilizador (não tóxico) excitado por uma luz visível no comprimento de onda adequado que, assim, produz espécies reativas de oxigênio (ERO's) que são altamente citotóxicas e podem levar à morte as células tratadas (Vera *et al.*, 2012; Hamblin; Hasan, 2004, Mc Donald; Dougherty, 2001; Wainwright, 1998).

Quando o fotossensibilizador é exposto a uma fonte de luz no comprimento de onda específico, correspondente à faixa de absorção do mesmo, pode ocorrer dois mecanismos de fotoprocessos que podem resultar na morte celular devido a danos oxidativos. No processo conhecido como Tipo I, ocorre a geração de radicais livres, como os radicais hidroxila. Isso se dá pela transferência de elétrons ou hidrogênio do fotossensibilizador ativado para moléculas próximas, as quais reagem com biomoléculas ou se unem para criar peróxido de hidrogênio no local, gerando danos celulares significativos (Perussi, 2007; Garland *et al.*, 2009; Melo; Perussi, 2012; Oliveira *et al.*, 2015). Essa reação costuma retirar átomos de hidrogênio de moléculas insaturadas, como os fosfolipídios encontrados nas membranas, desencadeando a peroxidação dos lipídios. Esse processo afeta a estrutura e a funcionalidade da membrana celular, reduzindo sua fluidez e aumentando a permeabilidade aos íons. Além disso, pode resultar na inativação de enzimas e receptores celulares presentes na membrana citoplasmática (Melo; Perussi, 2012; Alves *et al.*, 2014). No mecanismo Tipo II, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio presente no meio celular, resultando na formação de oxigênio singlete. Esse composto tem uma reação rápida e indiscriminada a uma ampla gama de biomoléculas, levando à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Garland *et al.*, 2009; Melo; Perussi, 2012; Alves *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). O efeito foto-oxidativo decorrente da reação Tipo II é amplamente reconhecido como o principal mecanismo nas inativações fotodinâmicas de micro-organismos (Melo; Perussi, 2012; Oliveira *et al.*, 2015).

A inativação fotodinâmica de fungos apresenta desafios significativos devido às características distintas desses micro-organismos. Sua parede celular densa e espessa, em comparação com a das bactérias, além do tamanho maior e da presença de uma membrana

nuclear, atua como barreira adicional durante a interação com o fotossensibilizador (Melo; Perussi, 2012; Calzavara-Pinton *et al.*, 2012). A parede celular dos fungos representa o primeiro ponto de contato com o fotossensibilizador. Nesse contexto, os fotossensibilizadores catiônicos demonstram maior eficácia na inativação fotodinâmica dos microrganismos. Isso se deve à característica negativa da parede celular, especialmente quando sua porosidade é reduzida pela presença de pigmentos dispostos ao seu redor. Esse cenário dificulta a penetração de fotossensibilizadores não catiônicos, tornando os catiônicos mais eficientes na interação e inativação dos fungos (Wainwright, 1998; Donnelly; McCarron; Tunney, 2008; Huang *et al.*, 2010; Melo; Perussi, 2012; Alves *et al.*, 2014).

Uma variedade de fotossensibilizadores, inclusive os fenotiazínicos catiônicos azul de metileno (AM) e azul de toluidina (AT), já foi utilizada em TFA e demonstraram inativação contra leveduras (Pinto *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016; Baltazar *et al.*, 2015; Rosseti; Chagas; Costa, 2014; Carvalho; Felipe; Costa, 2009; Munin *et al.*, 2007). A inativação antifúngica promovida pela TFA, utilizando algumas fenotiazinas, tais como AT e AM, como compostos fotossensíveis sobre *C. albicans* e *C. krusei* foi demonstrada em diferentes fases de crescimento de biofilme (Carvalho; Felipe; Costa, 2009; Giroldo *et al.*, 2009; Munin *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2006; Demidova; Hamblin, 2004; Prates *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2011). O efeito antimicrobiano de uma variedade de compostos fotossensíveis tem sido demonstrado por diferentes autores (Calzavara-Pinton *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2010; Harris; Chatfield; Phoenix, 2005; Wainwright, 1998), e o efeito fungicida de sais de fenotiazinas, utilizando o AT, também foi avaliado e expressou a eficácia da TFA, sobre crescimento, formação do biofilme e biofilme maduro de leveduras (Giroldo *et al.*, 2009; Rosseti; Chagas; Costa, 2014; Rosseti; Costa, 2014). Recentemente, foi demonstrado que células de *C. albicans* e *C. krusei* submetidas à TFA, utilizando azul de toluidina como agente fotossensível, apresentaram tanto uma inibição das células planctônicas como, também, na capacidade de formação de biofilme e, ainda, esse efeito está relacionado ao aumento na permeabilidade celular e da formação de ERO's no meio (Rosseti; Chagas; Costa, 2014; Silva *et al.*, 2018).

O uso do azul de toluidina e da TFA para inativação de biofilmes mistos de *Candida spp.* foi recentemente demonstrado (Rodrigues; Passos; Costa, 2023). Os autores demonstraram, pela primeira vez, que a TFA foi eficaz em inibir tanto a formação quanto biofilmes maduros mistos de *C. albicans* e *C. krusei*, relacionada a uma diminuição de *C. albicans* no meio. Apesar de diferentes autores já terem estudado o efeito inativador da TFA, com diferentes fotossensibilizadores, sobre biofilmes polimicrobianos, majoritariamente são biofilmes formados por interações entre fungo-bactérias, e as interações entre fungos como *C.*

*albicans* e não-*albicans* são escassos (Li *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2021; Palma *et al.*, 2018; Carmello *et al.*, 2017; Quishida *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2011).

## 2.4 Biofilmes

Os biofilmes são populações microbianas embebidas em uma matriz extracelular (MEC), composta principalmente por polissacarídeos e glicoproteínas, e que estão geralmente aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (Quishida *et al.*, 2015; Sachivkina; Podoprighora; Bokov, 2021). Embora os biofilmes possam aderir com competência a superfícies abióticas, como cateteres, dentaduras, próteses e outros dispositivos médicos, tornando sua presença um alerta para o aumento do risco de infecções graves; biofilmes também existem em superfícies bióticas como as mucosas, as superfícies dentárias, o trato urinário e o trato respiratório (Ramage *et al.*, 2009; Sachivkina; Podoprighora; Bokov, 2021).

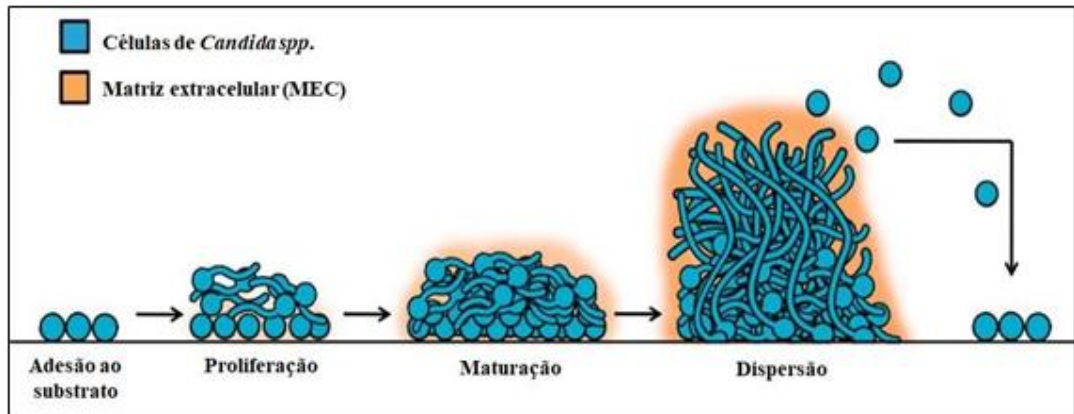
Os biofilmes são naturalmente mais resistentes contra a maioria dos agentes antimicrobianos e a formação de biofilme é um dos principais contribuintes para as altas taxas de mortalidade associadas às infecções nosocomiais (Douglas, 2009; Ramage *et al.*, 2009; Pierce *et al.*, 2017; Sachivkina; Podoprighora; Bokov, 2021).

A MEC é composta por substâncias poliméricas extracelulares secretadas pelas células dentro do biofilme, que compõe um conjunto de macromoléculas como proteínas (55%), carboidratos (25%), lipídeos (15%) e ácidos nucleicos (5%) (Zarnowski *et al.*, 2018; Ponde *et al.*, 2021). O polissacarídeo mais comum encontrado na MEC dos biofilmes de *C. albicans* são os mananos, frequentemente associados a  $\beta$ -1,6 glucanos, alvos para diversas terapias antifúngicas (Pierce *et al.*, 2017; Ponde *et al.*, 2021).

A presença de matriz extracelular no biofilme é uma característica essencial, uma vez que contribui para a estrutura do biofilme, fornece suporte físico e é fundamental para aumentar a tolerância a drogas antifúngicas (Nobile; Johnson, 2015; Pierce *et al.*, 2017). Entretanto, ela não está relacionada à resistência aos antifúngicos, pois apenas dificulta a difusão das drogas por todo o biofilme (Karygianni *et al.*, 2020).

A formação de biofilme é descrita em quatro etapas, que estão representadas a seguir na figura 4:

**Figura 4:** Estágios do desenvolvimento de um biofilme.



**Legenda:** Um esquema ilustrando os estágios de desenvolvimento de um biofilme de *Candida spp.* Adesão: as leveduras aderem a um substrato formando uma camada basal. Proliferação: as células se propagam e formam tubos germinativos, há o início da secreção de MEC. Maturação: as hifas são formadas e a MEC se acumula. Dispersão: as células desprendem do biofilme e são dispersas para semear novos locais.

**Fonte:** adaptado de Tsui, Kong e Jabra-Rizk (2016).

A primeira etapa compreende a adesão das células planctônicas ao substrato-alvo, que pode ser biótico ou abiótico, formando uma camada de blastóporos; essa etapa pode ocorrer num período de 0 a 11 horas. Na segunda etapa, ocorre a proliferação das células formadas e aderidas na etapa anterior, além da diferenciação morfogênica em hifas e/ou pseudohifas, e o início da excreção de matriz extracelular (MEC); num período de 12 a 30 horas. A terceira etapa é considerada a fase de maturação do biofilme, onde há a intensa excreção de MEC, o desenvolvimento dos filamentos formando uma rede de células e MEC interconectados; o biofilme é considerado mais resistente nesta etapa. Por fim, na quarta etapa é quando ocorre a dispersão de células que desprendem desse biofilme para disseminar e infectar novos alvos (Nobile; Johnson, 2015; Tsui; Kong; Jabra- Rizk, 2016).

A superexpressão de bombas de efluxo de drogas na fase inicial do biofilme e a composição de esteróis na membrana podem estar relacionadas à resistência dos biofilmes de *Candida spp.* (Mukherjee; Chandra, 2004; Thein; Samaranayake; Samaranayake, 2007).

#### 2.4.1 Biofilmes polimicrobianos

Biofilmes multiespécies existem como comunidades celulares complexas, diversas e heterogêneas de organismos abrangendo diferentes reinos filogenéticos. Em termos de saúde humana, tanto em indivíduos sadios quanto doentes, biofilmes polimicrobianos são prevalentes

(Wolcott *et al.*, 2013; Costa-Orlandi *et al.*, 2017). Além disso, essas comunidades complexas podem dificultar a identificação do agente etiológico da doença e, assim, dificultar o tratamento de escolha para tal (Kean *et al.*, 2018; Carolus; Van Dyck; Van Dijck, 2019; Barros *et al.*, 2020).

As interações entre os micro-organismos em um biofilme polimicrobiano podem ser neutras, antagonistas ou sinérgicas, podendo haver competição por nutrientes, substrato para adesão e espaço para proliferar; como também a produção de proteínas e moléculas que beneficiem o crescimento do outro organismo, ou até mesmo uma espécie servir de substrato ou como suporte para o desenvolvimento da outra (Pereira-Cenci *et al.*, 2008; Thein; Samaranayake; Samaranayake, 2007; Wolcott *et al.*, 2013; Costa-Orlandi *et al.*, 2017).

Pereira-Cenci *et al.* (2008) analisaram biofilmes mono-espécie e dupla-espécie de leveduras de *C. albicans*, *C. glabrata* e da bactéria *S. mutans*, e observaram que a bactéria favoreceu o crescimento de *Candida spp.*, tendo uma interação sinérgica; além disso, entre as espécies de *Candida* não houve interação antagonista, como geralmente era descrito na literatura, mostrando que os micro-organismos podem se co-agregar para potencializar o processo de adesão, etapa essencial para a instalação do biofilme.

O fungo *C. albicans* foi identificado como espécie predominante de biofilmes mistos de *Candida spp.* encontrados em tiras de resina acrílica dentária (Pathak; Sharma; Shrivastva, 2012). Essas estruturas complexas têm vantagens particulares que as protegem das defesas do hospedeiro e promovem interações mutuamente benéficas (Quishida *et al.*, 2015). Há relatos de que aproximadamente 27-56 % das infecções da corrente sanguínea por *C. albicans* adquiridas em ambientes nosocomiais são polimicrobianas (Barros *et al.*, 2020). Relações sinérgicas em biofilmes multiespécies produzem um efeito que as espécies de maneira isolada não causariam, podendo aumentar o tempo para recuperação do hospedeiro, bem como levar ao aumento da resistência antimicrobiana (Wolcott *et al.*, 2013; Costa-Orlandi *et al.*, 2017). Essas interações destacam a importância de mais pesquisas sobre os mecanismos e consequências da formação de biofilmes de espécies *C. albicans* e não-*albicans* (NAC), bem como sua caracterização (Lohse *et al.*, 2018; Wall *et al.*, 2019; Ponde *et al.*, 2021).

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* e analisar o efeito de terapias antifúngicas sobre o mesmo e suas espécies isoladas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar os biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei*, cultivados em diferentes meios de cultura (RPMI e Sabouraud-dextrose), utilizando o meio de diferenciação CHROMágar Candida;
- b) Caracterizar os biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei* quanto à importância da pré-adesão celular e à ordem de adição das espécies no meio, utilizando o meio de diferenciação CHROMágar Candida;
- c) Caracterizar os biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei*, cultivados em RPMI e Sabouraud-dextrose, quanto à ação da TFA com AT, avaliando a atividade metabólica e a produção de biomassa dos biofilmes e utilizando o meio de diferenciação CHROMágar Candida;
- d) Avaliar os efeitos do antifúngico Voriconazol sobre o crescimento e viabilidade de biofilme de *C. albicans*, *C. krusei* e co-culturas de *Candida spp.*;
- e) Avaliar os efeitos do antifúngico Voriconazol sobre a adesão de *C. albicans*, *C. krusei* e co-culturas de *Candida spp.*, em superfície de poliestireno;
- f) Analisar os efeitos do Voriconazol sobre a morfologia do biofilme de *C. albicans*, *C. krusei* e co-culturas de *Candida spp.*;
- g) Analisar o comportamento de *C. albicans* e *C. krusei* nas co-culturas, com diferentes proporções celulares e na presença do Voriconazol, utilizando o meio de diferenciação CHROMágar Candida.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização do biofilme dupla-espécie de *Candida spp.*

#### 4.1.1 Condições de crescimento e meio de cultura

Cepas ATCC de *C. albicans* (10231) e *C. krusei* (6258) foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha) e incubadas em ar atmosférico, a 37 °C, por 48 horas de incubação. Após esse período, uma amostra das culturas foi retirada da superfície do ágar e suspensa em solução fisiológica estéril (0,85% NaCl), com densidade celular de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, determinada em câmara de Neubauer.

Para avaliar a influência e o impacto de dois meios de cultura diferentes no desenvolvimento de biofilmes de uma co-cultura de *C. albicans* e *C. krusei* (1:1), foi utilizado caldo Sabouraud dextrose (SB) (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha) e RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Ambos meios foram selecionados devido ao uso frequente para cultivo de *Candida spp.* na literatura (Porfírio *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017; 2016; Weerasekera *et al.*, 2016).

#### 4.1.2 Identificação de *C. albicans* e *C. krusei* em meio CHROMágar *Candida*

Inicialmente, uma alíquota (10 µL) da co-cultura de *Candida spp.* em igual proporção (1:1) foi semeada em meio CHROMágar *Candida* para identificar a quantidade inicial de ambas as espécies nos experimentos.

Além disso, após os tratamentos, os biofilmes foram lavados 2 vezes com 200 µL de PBS para remover o meio e as células não aderentes. Em seguida, 200 µL de solução salina foram adicionados a cada poço. As células dos biofilmes formados foram colhidas por raspagem mecânica, diluídas 2.000 vezes em soro fisiológico e posteriormente semeadas em meio CHROMágar *Candida*. Após 48 horas a 37 °C, *C. albicans* (verde) e *C. krusei* (rosa claro/branco suave) foram identificados para determinação quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) presentes após cada ensaio.

#### **4.1.3 Viabilidade por meio da atividade mitocondrial utilizando ensaio XTT**

Viabilidade monitorada por um ensaio metabólico baseado na redução do sal sódico de XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e de menadione 0,4 mM (Sigma, MO, EUA), numa proporção de 4:1. Para isso, uma solução contendo PBS e XTT/menadione (na proporção de 6:1) foi feita e, então, aliquotada (100 µL) em todos os poços de tratamento para corar por até 2 h a 37 °C. O produto da reação foi medido por absorbância a 490 nm (DO<sub>490</sub>) em um espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, EUA).

#### **4.1.4 Viabilidade por quantificação da biomassa utilizando ensaio Safranina**

A quantificação da biomassa pela produção de matriz extracelular também foi monitorada por meio de um protocolo de coloração com Safranina (Ommen; Zobek; Meyer, 2017), e foi adaptado de Salvatore *et al.* (2022). Para isso, após a lavagem das amostras, 50 µL de Safranina 0,1 % (Dynamics Contemporary Chemical LTDA, Indaiatuba, SP, Brasil) foi adicionada em cada poço por 30 minutos à temperatura ambiente, sob condições assépticas. Em seguida, os poços foram lavados com PBS (200 µL) pelo menos três vezes, até a remoção de todo o corante. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e, em seguida, o corante foi solubilizado por uma solução de etanol 50 % em água destilada. Este sobrenadante foi transferido para outra placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) e a absorbância medida com densidade óptica (DO) a 492 nm (DO<sub>492</sub>) em um espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, EUA).

#### **4.1.5 Formação de biofilme dupla-espécie: diferentes métodos de adesão e meios de cultura**

Para verificar se o método de adesão celular, o meio de cultura e a ordem em que as espécies do biofilme polimicrobiano são adicionadas para sua formação, podem definir a composição celular do biofilme produzido, foram feitos ao todo quatro métodos.

A fim de analisar a importância da pré-adesão celular à placa para a composição do biofilme com ambas espécies de *Candida* em igual proporção, foram feitos:

- Método número um – células (25  $\mu\text{L}$ ) da co-cultura (1:1) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) com meio de crescimento em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , por 24 h de incubação a 37 °C.
- Método número dois – células (200  $\mu\text{L}$ ) da co-cultura (1:1) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) e mantidas a 37 °C por 90 minutos para adesão primária à superfície da placa. Em seguida, os poços foram lavados 2 vezes com 100  $\mu\text{L}$  de PBS e o meio foi adicionado, em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , por 24 h de incubação a 37 °C.

Uma caracterização das células presentes na estrutura dos biofilmes foi realizada em biofilmes produzidos usando um período de adesão celular com apenas uma espécie de *Candida* e, após a remoção do conteúdo das placas, as células não aderidas foram removidas e a outra espécie de *Candida* foi adicionada para formar biofilmes em RPMI-1640 ou em SB. Para isso, foram feitos:

- Método número três – células (100  $\mu\text{L}$ ) da suspensão de *C. albicans*  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (NestBiotechnology, Rahway, EUA) e mantidas a 37 °C por 90 minutos para adesão primária à superfície da placa. Em seguida, os poços foram lavados 2 vezes com 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Então, células da suspensão de *C. krusei*  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e meio foram adicionados aos poços, em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , por 24 h de incubação a 37 °C.
- Método número quatro – células (100  $\mu\text{L}$ ) da suspensão de *C. krusei*  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (NestBiotechnology, Rahway, EUA) e mantidas a 37 °C por 90 minutos para adesão primária à superfície da placa. Em seguida, os poços foram lavados 2 vezes com 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Então, células da suspensão de *C. albicans*  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e meio foram adicionados aos poços, em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , por 24 h de incubação a 37 °C.

Após o período de incubação, cada poço de cada método foi submetido ao ensaio ‘Identificação de *C. albicans* e *C. krusei* em meio CHROMágar Candida’. Os poços que não foram submetidos ao referido ensaio, foram levados ao microscópio para análise qualitativa da morfologia dos biofilmes.

#### **4.1.6 Influência do meio de cultura sobre a formação de biofilme dupla-espécie de *Candida spp.***

Duas condições de meio foram utilizadas, sendo RPMI e SB, citados anteriormente. Células (25 µL) da co-cultura (1:1) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) com meio de crescimento e VOR (10 µg.mL<sup>-1</sup>), em um volume final de 200 µL, por 24 h de incubação a 37 °C. Após o período de incubação, cada poço foi submetido ao ensaio 'Identificação de *C. albicans* e *C. krusei* em meio CHROMágar Candida'. Os poços que não foram submetidos ao referido ensaio foram levados ao microscópio para análise qualitativa da morfologia dos biofilmes.

#### **4.1.7 Influência do meio de cultura sobre o biofilme dupla-espécie maduro de *Candida spp.***

Células (25 µL) da co-cultura (1:1) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) com meio de cultura (RPMI ou SB), em um volume final de 200 µL, por 24 h de incubação a 37 °C. Então, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de PBS e um meio fresco e VOR (10 µg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados aos poços por mais 24 h a 37 °C.

Quatro condições de meio foram realizadas, sendo elas: #1 biofilme formado com RPMI e adição de RPMI fresco (denominado RPMI+RPMI); #2 biofilme formado com RPMI e adição de SB fresco (denominado RPMI+SB); #3 biofilme formado com SB e adição de SB fresco (denominado SB+SB); e #4 biofilme formado com SB e adição de RPMI fresco (denominado SB+RPMI).

Após o período de incubação, cada poço foi submetido ao ensaio 'Identificação de *C. albicans* e *C. krusei* em meio CHROMágar Candida'. Os poços que não foram submetidos ao referido ensaio foram levados ao microscópio para análise qualitativa da morfologia dos biofilmes.

#### **4.1.8 Influência do meio de cultura sobre a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em biofilmes dupla-espécie maduros**

Rodrigues, Passos e Costa (2023) estudaram o efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFA) com Azul de Toluidina (AT) sobre biofilmes dupla-espécie de *C. albicans*/*C. krusei* e verificaram que o meio RPMI propiciou o desenvolvimento de *C. albicans* sobre *C. krusei* e que a inibição por TFA foi devido a redução de *C. albicans* no meio. Esses dados tornaram evidentes a necessidade da caracterização desse biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* e do estudo aprofundado de fatores que podem impactar a composição desses biofilmes (como a influência do meio de cultura utilizado).

Células (25  $\mu\text{L}$ ) da co-cultura (1:1) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) com meio de cultura (RPMI ou SB), em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , por 24 h de incubação a 37 °C. Então, os poços foram lavados 1 vez com 200  $\mu\text{L}$  de PBS e incubados no escuro por 10 min, em temperatura ambiente, na presença ou ausência de 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  do FS azul de toluidina (AT). Biofilmes incubados apenas em solução fisiológica estéril foram incluídos como controles. Então, os biofilmes foram irradiados seguindo o protocolo de Rodrigues *et al.* (2023). Brevemente, a fonte de luz utilizada foi um LED (*Light-emitting Diode*) com potência de saída de 0,069 W e pico de comprimento de onda de 630 nm. O feixe de laser iluminou uma área de 0,38  $\text{cm}^2$ , resultando em uma dose de energia de 30  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , aplicada por 2 min e 45 s. Após a irradiação, o conteúdo dos poços permaneceu em repouso por 15 minutos no escuro, e então os poços foram lavados e os meios RPMI-1640 ou SB foram adicionados à placa por mais 24 horas. Posteriormente, os biofilmes dupla-espécie produzidos foram lavados 3 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS e foram submetidos aos ensaios de XTT, Safranina e 'Identificação de *C. albicans* e *C. krusei* em meio CHROMágar Candida'.

#### **4.1.9 Análise qualitativa: morfologia dos biofilmes**

Após os diferentes tratamentos, as amostras foram examinadas em microscópio óptico por microscopia de luz (Eclipse TS100, Nikon, Japan) e as imagens foram capturadas com um sistema de câmera digital para microscópios Moticam-580 (Motic Electric Group Co., Ltd) acoplada ao fotomicroscópio e a um microcomputador (IntelVR PentiumVR) utilizando o software Motic Image Plus 2.0 (Motic Electric Group Co., Ltd).

#### **4.1.10 Análise estatística**

Os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) das contagens de UFC de diferentes experimentos independentes e dos valores obtidos no espectrofotômetro, realizados pelo menos quatro vezes e em triplicata. O método estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida do teste post-hoc de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### **4.2 Culturas isoladas de *Candida albicans* e *Candida krusei* e suas co-culturas**

#### **4.2.1 Condições de crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* e suas co-culturas**

Culturas de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. krusei* (ATCC 6258) foram plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) e incubadas em ar atmosférico (37 °C). Após 48 horas de incubação, uma amostra das colônias foi removida da superfície da placa de ágar e ressuspensa em solução fisiológica estéril (0,85% NaCl). Então, foram determinadas diferentes densidades celulares ( $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>), utilizando a câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de metileno (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>).

Para os experimentos mistos de *Candida spp.* foram feitas três co-culturas de *C. albicans* e *C. krusei* ( $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>) com diferentes proporções. A saber: volumes iguais de *Candida spp.* (1:1); maior proporção de *C. albicans* (9:1); e menor proporção de *C. albicans* em relação à *C. krusei* (1:9). Para facilitar o entendimento, foram denominadas como co-cultura #1 (CC1), co-cultura #2 (CC2) e co-cultura #3 (CC3), respectivamente.

#### **4.2.2 Efeito do Voriconazol sobre o crescimento de *Candida spp.***

Suspensões celulares de  $10^4$  e  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 24 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA), contendo caldo Sabouraud-dextrose (SB) (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha), na presença de Voriconazol (VOR) (Cristália Ind. Quim. Farm., São Paulo, SP, Brasil) variando de 0,005 a 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em um volume final de 2 mL, e incubados em condições aeróbias a 37 °C por 18h. Para os experimentos mistos, foram utilizadas suspensões celulares das três co-culturas de

*Candida spp.* a  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> e VOR variando de 0,005 a 10 µg.mL<sup>-1</sup>. O crescimento foi monitorado registrando a densidade óptica (DO) em 570 nm (DO<sub>570</sub>) usando o espectrofotômetro SynergyHT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos seis vezes, e os dados obtidos foram expressos como porcentagem (%) de crescimento em relação ao grupo controle (100%) - células incubadas na ausência de VOR.

#### **4.2.3 Efeito do Voriconazol sobre a formação de biofilme de *Candida spp.***

Suspensões celulares (25 µL) a  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> de *C. albicans*, *C. krusei* e suas co-culturas foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) com meio RPMI- 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e VOR (variando de 0,01 a 10 µg.mL<sup>-1</sup>), em um volume final de 200 µL, por 24 h de incubação a 37 °C. Após este período, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS (100 µL) para remover as células não aderidas e vestígios do meio, e os ensaios XTT (item 4.1.3) e Safranina (item 4.1.4) foram aplicados, sendo Safranina apenas para as culturas isoladas. O protocolo de ‘Identificação de espécies no meio CHROMágar *Candida*’ (item 4.1.2) foi realizado apenas para os biofilmes dupla-espécie.

Ambos os ensaios (XTT e Safranina) foram realizados em triplicata e repetidos quatro vezes, e os dados obtidos foram expressos como porcentagem (%) de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%) - células incubadas na ausência de VOR. A morfologia do biofilme foi observada em um microscópio óptico (item 4.1.9) antes dos ensaios de viabilidade.

#### **4.2.4 Efeito do Voriconazol sobre viabilidade do biofilme maduro de *Candida spp.***

Suspensões celulares (200 µL) a  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> de *C. albicans*, *C. krusei* e suas co-culturas foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) por 90 minutos, a 37°C, para adesão primária à placa. Em seguida, os poços foram lavados uma vez com 100 µL de PBS e adicionado o meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), em um volume final de 200 µL, por 24 h de incubação a 37 °C. Os poços foram, então, lavados 2 vezes com PBS (200 µL) e foi adicionado novo meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e VOR variando de 0,05 a 10 µg.mL<sup>-1</sup>, num volume final de 0,2 mL, por mais 24 h a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS (100 µL) a fim de remover as células não aderidas e vestígios de meio, e os ensaios XTT e Safranina

foram aplicados, sendo Safranina apenas para as culturas isoladas. O protocolo de 'Identificação de espécies no meio CHROMágar Candida' foi realizado apenas para os biofilmes dupla-espécie.

Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos quatro vezes, e os dados obtidos foram expressos como porcentagem (%) de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%) - células incubadas na ausência de VOR. A morfologia de formação do biofilme foi observada em um microscópio óptico antes dos ensaios de viabilidade.

#### **4.2.5 Efeito do Voriconazol sobre a adesão à placa de poliestireno de *Candida* spp.**

Suspensões celulares (25 µL) a  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> de *C. albicans*, *C. krusei* e suas co-culturas foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, EUA) com salina (0,85 % NaCl) e VOR (0,05; 0,5 e 5 µg.mL<sup>-1</sup>), em um volume final de 200 µL, por 90 minutos a 37 °C. Então, os poços foram lavados uma vez com 100 µL de PBS e 200 µL de meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram adicionados em cada poço, e permaneceram em incubação por 24h a 37 °C. Após esse período, os poços foram lavados 2 vezes com PBS (100 µL) a fim de remover as células não aderidas e vestígios de meio, e o ensaio XTT foi realizado. O protocolo de 'Identificação de espécies no meio CHROMágar Candida' foi realizado apenas para os biofilmes dupla-espécie.

O ensaio foi realizado em triplicata e repetido quatro vezes, e os dados obtidos foram expressos como porcentagem (%) de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%) - células incubadas na ausência de VOR.

## 5 RESULTADOS

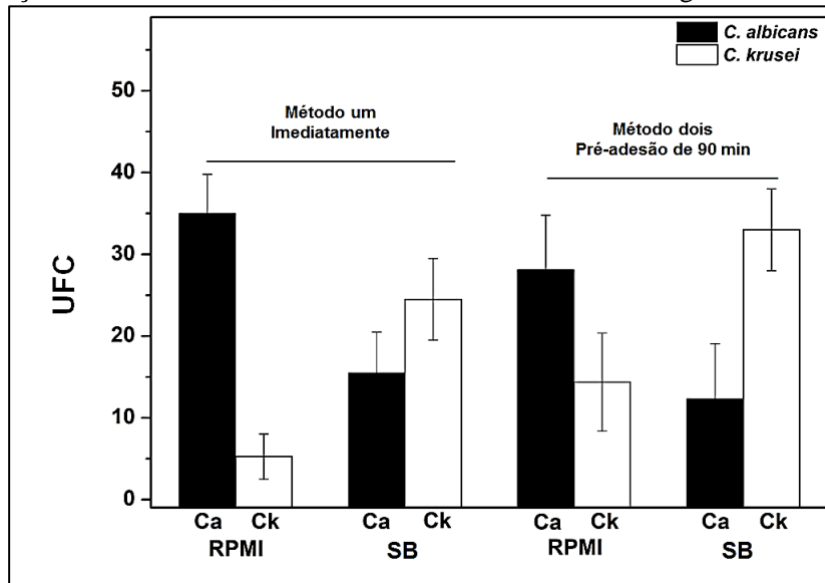
### 5.1 Caracterização do biofilme dupla-espécie de *C. albicans*/*C. krusei*

#### 5.1.1 Efeito do meio de cultura, da pré-adesão celular à placa e a interação entre as espécies sobre a composição de biofilmes mistos produzidos por *Candida* spp.

Para determinar a influência do meio de cultura (RPMI ou SB), da adesão celular prévia à placa, e da sequência de adição de espécies para a formação de biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. krusei*, foi realizada uma caracterização das células presentes na estrutura dos biofilmes produzidos identificando o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* no meio CHROMagar Candida (Figuras 5 e 6).

Foi observado que independente da adesão primária de 90 min ou não, predominância de *C. albicans* sobre *C. krusei* foi observada usando meio RPMI. Além disso, em biofilmes produzidos com SB foi observada uma predominância de *C. krusei* sobre *C. albicans*. No entanto, a proporção entre as espécies de *Candida* foi diferente quando houve adesão primária de 90 min ou sem pré-adesão (Figura 5). A solução fisiológica estéril é sempre o meio utilizado durante a adesão celular por 90 min. Utilizando o meio RPMI para produção de biofilmes, observou-se uma relação de *C. albicans*/*C. krusei* de 6,7 e 1,9 em biofilmes produzidos imediatamente e após 90 min de adesão celular, respectivamente. Este resultado foi relacionado principalmente com o aumento do número de UFCs de *C. krusei* de 5,2 para 14,4 em biofilmes formados imediatamente e após 90 min de adesão celular, respectivamente; sugerindo que o meio RPMI pode inibir a adesão de *C. krusei*. Em contrapartida, na presença de SB houve um aumento no número de *C. krusei*/*C. albicans* de 1,3 para 4,3 em biofilmes produzidos imediatamente e após adesão celular por 90 min, respectivamente.

**Figura 5:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos produzidos em diferentes condições de meio e adesão, identificados em meio CHROMágar Candida.



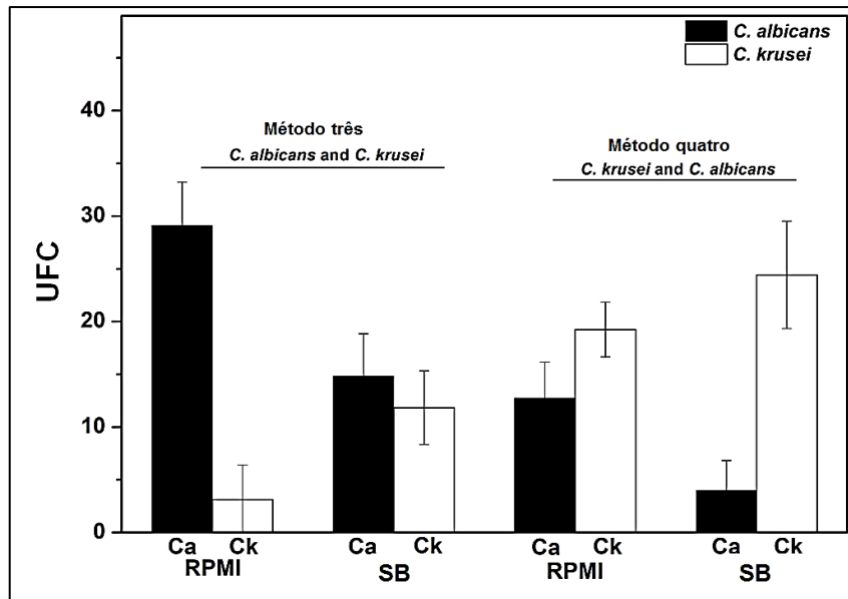
**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* foi determinado após a formação de biofilme dupla-espécie em meio RPMI ou SB. Biofilmes formados diretamente (método um) da co-cultura *C. albicans* e *C. krusei* (1:1) ou pré-aderidos por 90 minutos à superfície (método dois). Ca = *C. albicans* (colunas pretas), Ck = *C. krusei* (colunas brancas). Os dados são média ± DP (n=4).

**Fonte:** o autor.

Nos biofilmes onde uma espécie de *Candida* foi adicionada para pré-adesão celular e depois a outra espécie, também foi possível observar a relação de *Candida spp.* presente no meio (Figura 6). Quando *C. albicans* foi adicionada primeiro, a relação *C. albicans/C. krusei* foi de 11,2 no meio RPMI, mas no meio SB houve uma redução acentuada dessa razão *C. albicans/C. krusei* para ~1. Por outro lado, quando a adição primária foi de *C. krusei*, observou-se sua predominância sobre *C. albicans*, tanto em RPMI quanto em SB. Nesta condição, em meio RPMI ou SB, foi observada uma diminuição significativa no número de UFCs de *C. albicans* de 12 para 4 em biofilmes produzidos, respectivamente. Em meio SB observou-se uma razão de *C. krusei/C. albicans* de 6,1.

Juntos, estes resultados demonstraram que tanto o meio usado durante a formação do biofilme quanto a sequência das espécies de *Candida* adicionadas podem definir a composição celular na estrutura do biofilme produzido.

**Figura 6:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos produzidos em diferentes meios e sob influência da ordem de adesão das espécies, identificados em meio CHROMágar Candida.



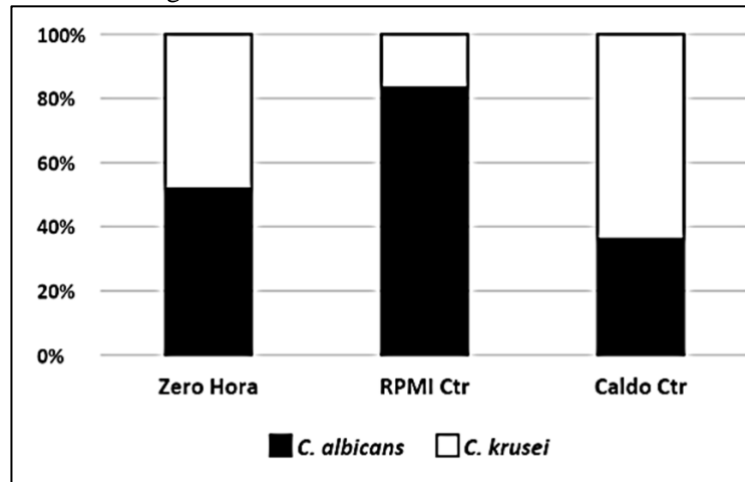
**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* foi determinado após a formação de biofilme dupla-espécie (1:1) em meio RPMI ou SB. Biofilmes formados a partir de *C. albicans* pré-aderida por 90 minutos à superfície e em seguida foi adicionado *C. krusei* (método três); ou *C. krusei* aderiu por 90 minutos à superfície e então *C. albicans* foi adicionada (método quatro). Ca = *C. albicans* (colunas pretas), Ck = *C. krusei* (colunas brancas). Os dados são média  $\pm$  DP (n=4).

**Fonte:** o autor.

### 5.1.2 Biofilmes mistos de *Candida* spp. em meio RPMI e SB submetidos ao Voriconazol

Para ter controle de que as co-culturas de *Candida* spp. iniciaram cada experimento na proporção proposta (1:1), elas foram plaqueadas em meio CHROMágar Candida para posterior contagem de UFCs. A Figura 7 representa a quantidade de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* na co-cultura (1:1) relacionando ao percentual de cada uma no todo da cultura (100%). É possível observar que as co-culturas iniciais (zero hora) realmente iniciaram com igual proporção de *C. albicans* (50%) e *C. krusei* (50%); nota-se também que os meios RPMI e SB foram capazes de alterar a quantidade de cada espécie nas co-culturas após incubação.

**Figura 7:** Proporção de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* nas co-culturas sob diferentes meios, identificadas em meioCHROMágar Candida.



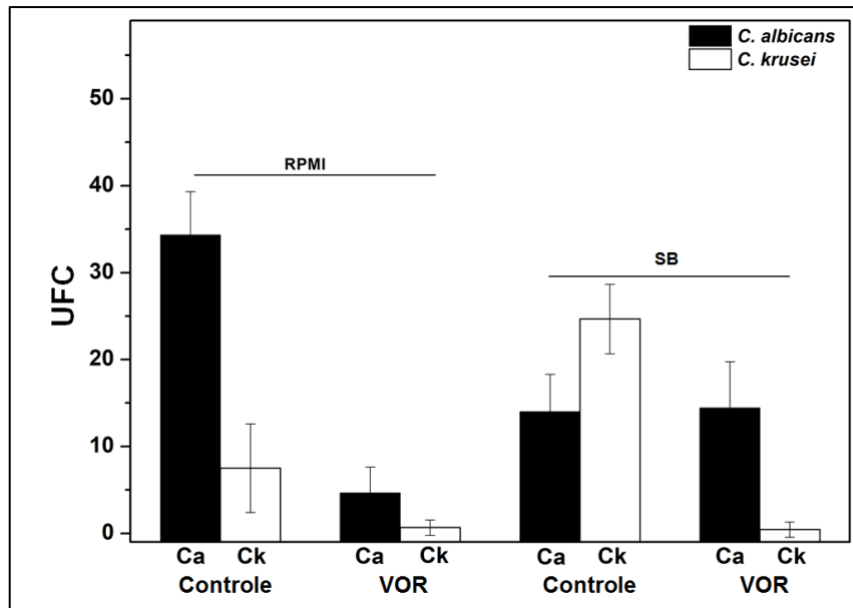
**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* da co-cultura inicial (1:1) foi determinado antes dos experimentos (ZERO HORA); e após a formação de biofilme dupla-espécie na ausência de VOR em meio RPMI (RPMI Ctr) ou caldo Sabouraud-dextrose (Caldo Ctr). *C. albicans* (colunas pretas), *C. krusei* (colunas brancas). Os valores representam o percentual de cada espécie no todo (100 %). Os dados são médias das UFCs (n=4).

**Fonte:** o autor.

A influência do meio de cultura sobre os biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. krusei* e o efeito do VOR sobre esses biofilmes também foi avaliada (Figura 8). Apesar da co-cultura inicial ter a mesma quantidade de *C. albicans* e *C. krusei*, quando submetida aos diferentes meios de cultivo (RPMI ou SB), essa proporção mudou nitidamente. O biofilme formado em meio RPMI apresentou cinco vezes mais UFCs de *C. albicans* que *C. krusei*. Em contrapartida, o biofilme formado em meio SB pareceu beneficiar o crescimento e desenvolvimento de *C. krusei*, mas tinha apenas duas vezes mais número de UFCs que *C. albicans*.

Voriconazol foi capaz de inibir a viabilidade de ambas espécies (*C. albicans* e *C. krusei*) em ~84 e 90 %, respectivamente, em meio RPMI. Entretanto, no meio SB, o VOR inibiu apenas *C. krusei* (~ 100 %) e não teve efeito sobre *C. albicans*. Isso pode sugerir que a redução de *C. krusei* no meio SB, na presença do VOR 10 µg.mL<sup>-1</sup>, pode ter sido propício para o desenvolvimento de *C. albicans*.

**Figura 8:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos produzidos em diferentes condições de meio de cultura, na presença de Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* foi determinado após a formação de biofilme dupla-espécie na ausência (controle) ou presença de VOR 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (VRC) em RPMI ou caldo Sabouraud-dextrose (SDB). Ca = *C. albicans* (colunas pretas), Ck = *C. krusei* (colunas brancas). Os dados são média  $\pm$  DP (n=4).

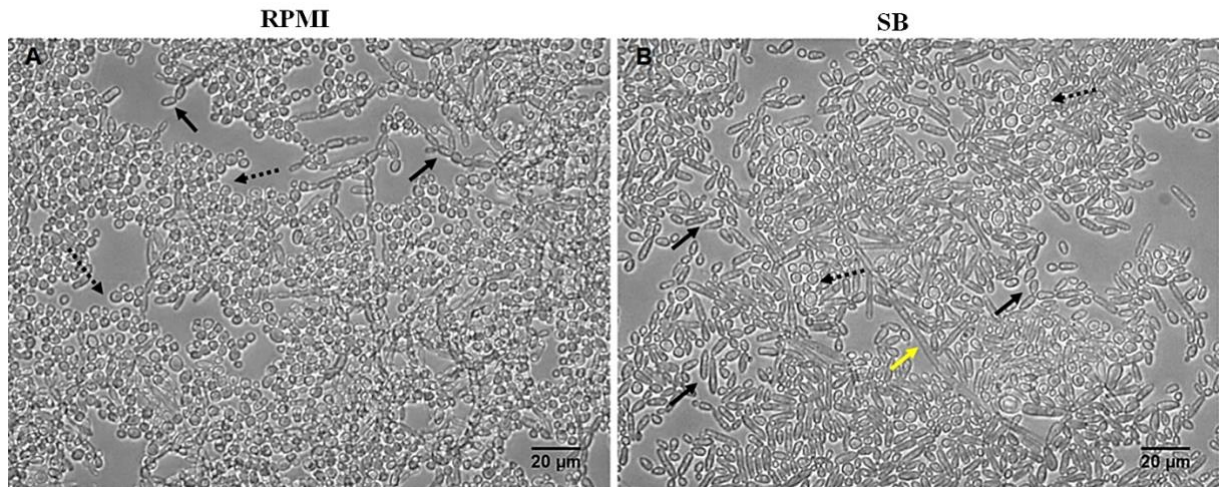
**Fonte:** o autor.

### 5.1.3 Análise morfológica dos biofilmes mistos formados por *Candida* spp. sob diferentes meios de cultura

Uma análise qualitativa dos biofilmes formados por co-culturas (1:1) de *C. albicans* e *C. krusei*, nos meios RPMI e SB, foi feita visando caracterizá-los (Figura 9).

É possível notar que na presença do meio RPMI (Figura 9A) há uma prevalência de características dos biofilmes formados por *C. albicans*. São elas: leveduras arredondadas, biofilme robusto e preenchendo quase todo o campo da fotomicrografia, inclusive com células sobrepostas. Também é possível identificar algumas leveduras ovaladas, específicas de *C. krusei*, mas em menor quantidade. Já no biofilme formado na presença do meio SB (Figura 9B), ocorre o oposto; há maior prevalência de estruturas características de *C. krusei*, e o biofilme não parece tão espesso. Corroborando com os dados do item anterior, em que a contagem de UFCs demonstrou uma prevalência de *C. albicans* no biofilme formado em meio RPMI, e *C. krusei* no biofilme formado em meio SB.

**Figura 9:** Morfologia do biofilme dupla-espécie formado em diferentes condições de meio de cultura.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. Biofilme dupla-espécie formado na presença de meio RPMI (A) e meio SB (B), mostrando a diferença morfológica dos biofilmes e a prevalência das espécies de *Candida* em cada um. As setas sólidas pretas indicam leveduras *C. krusei* (leveduras ovais); setas tracejadas pretas indicam leveduras *C. albicans* (leveduras arredondadas); e a seta sólida amarela indica possível pseudo-hifa. Barra de escala = 20 μm.

**Fonte:** o autor.

#### 5.1.4 Influência do meio de cultura sobre biofilmes maduros mistos de *Candida spp.* submetidos ao Voriconazol

A influência dos meios de cultura (RPMI ou SB) e o efeito do VOR sobre biofilmes maduros formados por co-culturas (1:1) de *C. albicans* e *C. krusei* foi avaliada (Figuras 10 e 11). Como visto anteriormente, os meios RPMI e SB afetam significativamente a composição celular dos biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.*, em que o meio RPMI parece beneficiar o desenvolvimento de *C. albicans* e SB o desenvolvimento de *C. krusei*. Aqui observou-se que a adição de um novo meio fresco aos biofilmes formados com RPMI ou SB também mudaram sua composição celular, mesmo que já houvesse uma estrutura complexa de biofilme formado nas placas de microtitulação.

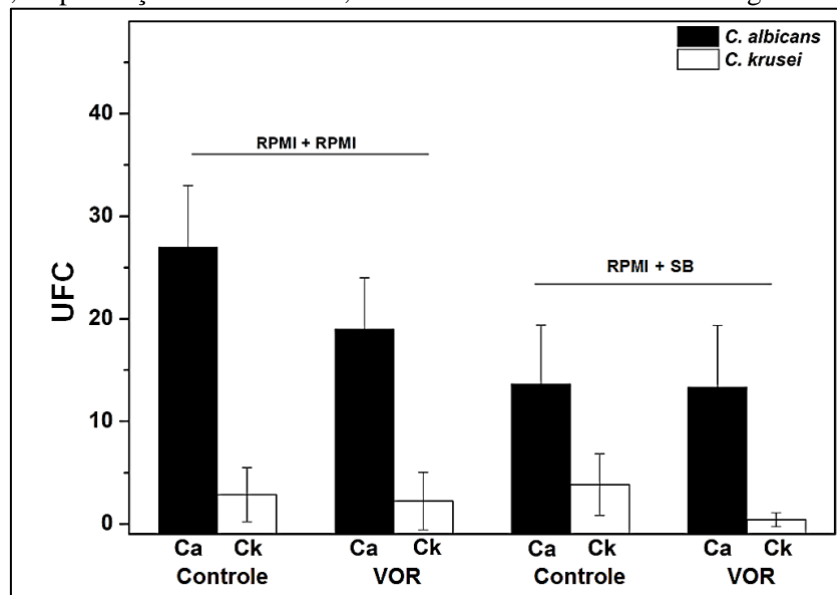
O biofilme misto com prevalência de *C. krusei* foi formado apenas com meio SB (SB+SB). Quando houve adição de RPMI ao biofilme formado com meio SB (SB+RPMI) a composição celular foi alterada e *C. albicans* prevaleceu, mas não acentuadamente. O número de UFCs de *C. albicans* aumentou de maneira proporcional ao número de UFCs de *C. krusei* que diminuiu no meio (Figura 11). No entanto, o biofilme formado com RPMI e adição de SB (RPMI+SB), comparado ao biofilme apenas em meio RPMI (RPMI+RPMI), não apresentou alteração na composição celular com prevalência de *C. albicans* sobre *C. krusei*, mas teve a quantidade de *C. albicans* levemente reduzida (Figura 10).

O efeito do VOR nesses biofilmes maduros mistos formados em diferentes composições de meio de cultura também foi avaliado. *C. albicans* não foi significativamente suscetível ao VOR nos meios RPMI+SB e SB+SB, porém VOR foi capaz de reduzir ~ 30 e 60 % do número de UFCs de *C. albicans* nos meios RPMI+RPMI e SB+RPMI, respectivamente. Sugere-se que, apesar do RPMI ter beneficiado a proliferação de *C. albicans* no meio (SB+RPMI), a adesão primária do biofilme à superfície em SB não foi tão forte; isso fez com que as leveduras de *C. albicans* ficassem mais vulneráveis e disponíveis ao VOR.

Por outro lado, *C. krusei* foi suscetível ao VOR apenas nas condições de meio em que *C. albicans* não foi suscetível (RPMI+SB e SB+SB), com taxas de inibição da viabilidade de ~50 e 80 %, respectivamente. Curiosamente, apesar do biofilme misto em SB+SB ter tido prevalência de *C. krusei*, foi o meio em que ocorreu a maior inibição por VOR, enquanto *C. albicans* não foi inibida.

Desta forma, pode haver uma competição entre ambas as espécies no meio e aquela que não consegue fazer uma melhor adesão à placa, está mais sujeita ao efeito do antifúngico por não estar embebida na MEC do biofilme.

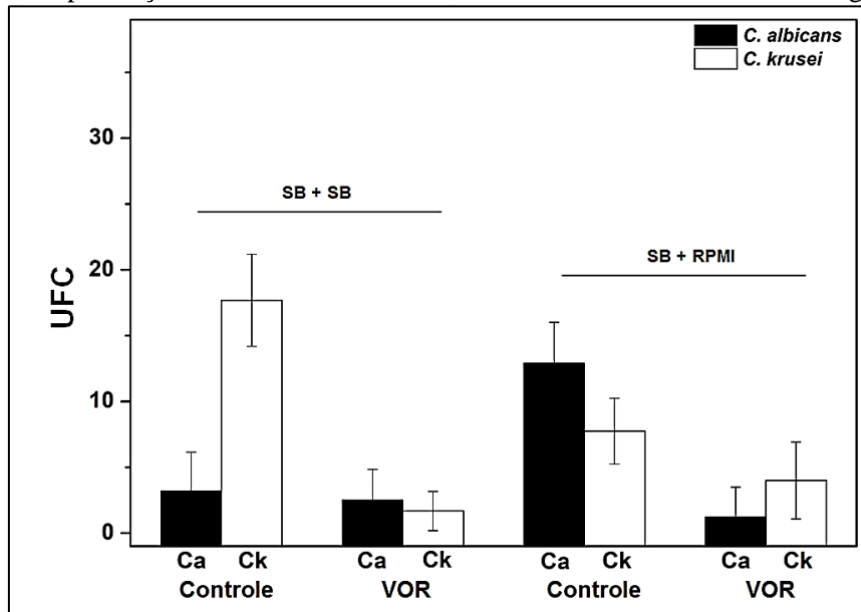
**Figura 10:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos maduros formados, primariamente, na presença de RPMI-1640, identificados em meio CHROMÁgar Candida.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* foi determinado após o biofilme maduro formado na ausência (controle) ou presença de VOR 10 µg.mL<sup>-1</sup> (VOR) sob diferentes condições de meio. Biofilme maduro de dupla-espécie formado apenas com RPMI (RPMI+RPMI); formado com RPMI e depois SB (RPMI+SB). Ca = *C. albicans* (colunas pretas), Ck = *C. krusei* (colunas brancas). Os dados são média ± DP (n=4).

**Fonte:** o autor.

**Figura 11:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos maduros formados, primariamente, na presença de Sabouraud-dextrose, identificados em meio CHROMágar Candida.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* foi determinado após o biofilme maduro formado na ausência (controle) ou presença de VOR  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (VOR) sob diferentes condições de meio. Biofilme maduro de dupla-espécie formado apenas com SB (SB+SB); e formado com SB e depois RPMI (SB+RPMI). Ca = *C. albicans* (colunas pretas), Ck = *C. krusei* (colunas brancas). Os dados são média  $\pm$  DP (n=4).

**Fonte:** o autor.

### 5.1.5 Análise morfológica dos biofilmes maduros mistos sob diferentes meios de cultura

Uma análise qualitativa de biofilmes maduros formados por co-culturas (1:1) de *C. albicans* e *C. krusei*, nos meios RPMI e SB foi feita (Figura 12). Como visto anteriormente, o biofilme misto formado no meio RPMI é morfológicamente semelhante aos biofilmes de *C. albicans*, enquanto o biofilme formado no meio SB possui mais características de *C. krusei* (compare Figura 12, A e C).

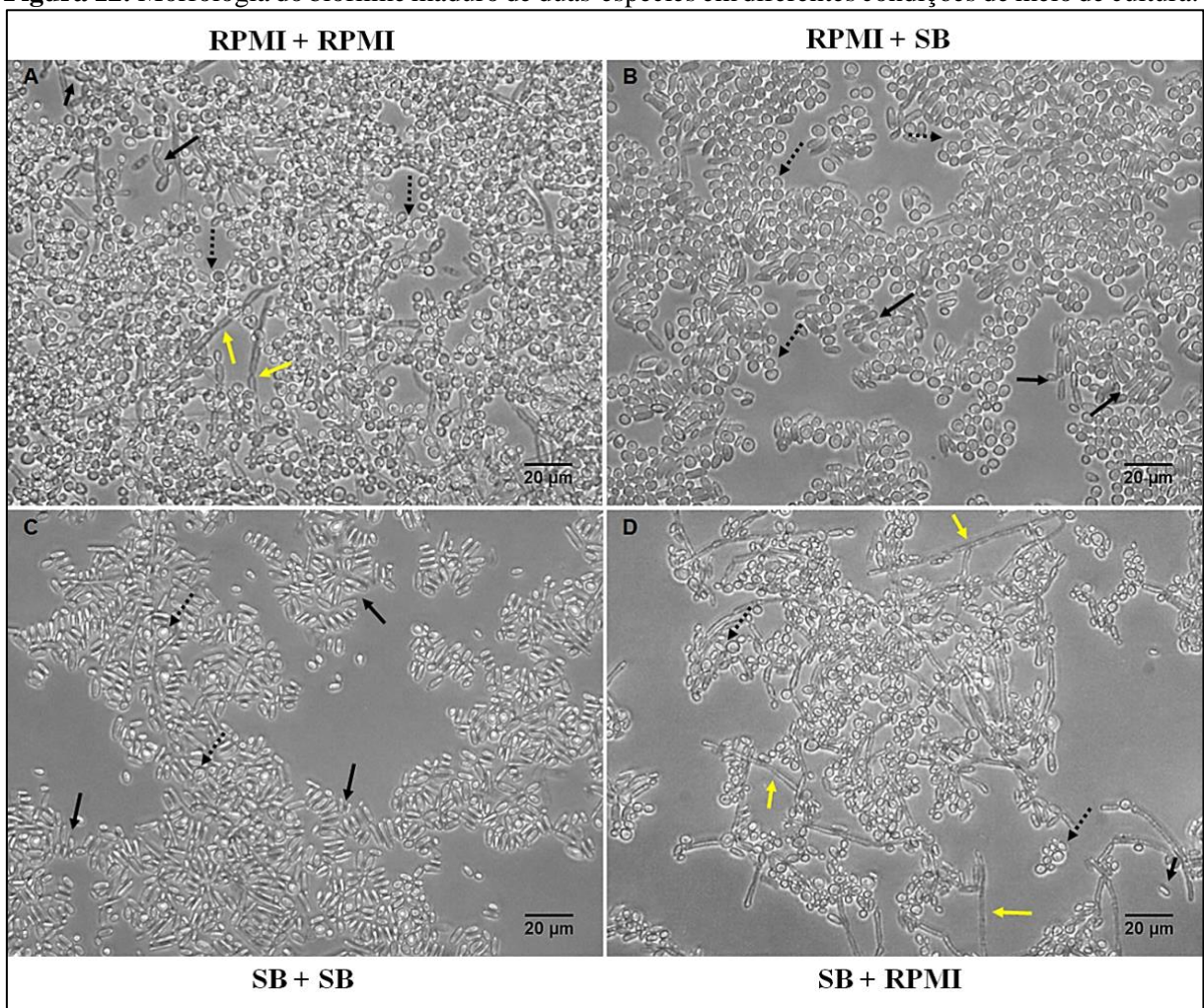
Um biofilme maduro é formado por 24 h em um meio de cultura e, então, é adicionado um novo meio fresco por mais 24 h. Quando o meio SB foi adicionado ao biofilme formado em meio RPMI (RPMI+SB), houve uma redução de leveduras arredondadas e um aumento de leveduras ovaladas; além disso, houve o desaparecimento de elementos hifais no meio, e redução do número de células também (compare Figura 12, A e B). Por outro lado, quando foi adicionado RPMI ao biofilme formado em SB (SB+RPMI), houve um aumento de leveduras redondas e uma redução acentuada de leveduras ovais, além da notável presença de filamentos (compare Figura 12, C e D).

Esses resultados apenas reforçaram a ideia de que as espécies de *Candida* analisadas (*C. albicans* e *C. krusei*) tiveram preferência por um meio de cultura durante a

formação de biofilmes, onde cada um desses meios propiciou o desenvolvimento de biofilmes característicos de *C. albicans* ou *C. krusei*, ainda que fossem mistos. Ademais, esses resultados demonstraram que os meios RPMI e SB podem interferir na composição morfológica do biofilme, independente da etapa de desenvolvimento em que ele esteja.

Juntos, esses resultados demonstraram que o meio usado para produzir biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. krusei* pode produzir modificações significativas no arranjo dos biofilmes e, conseqüentemente, modificar o efeito do VOR na inibição dos mesmos.

**Figura 12:** Morfologia do biofilme maduro de duas-espécies em diferentes condições de meio de cultura.



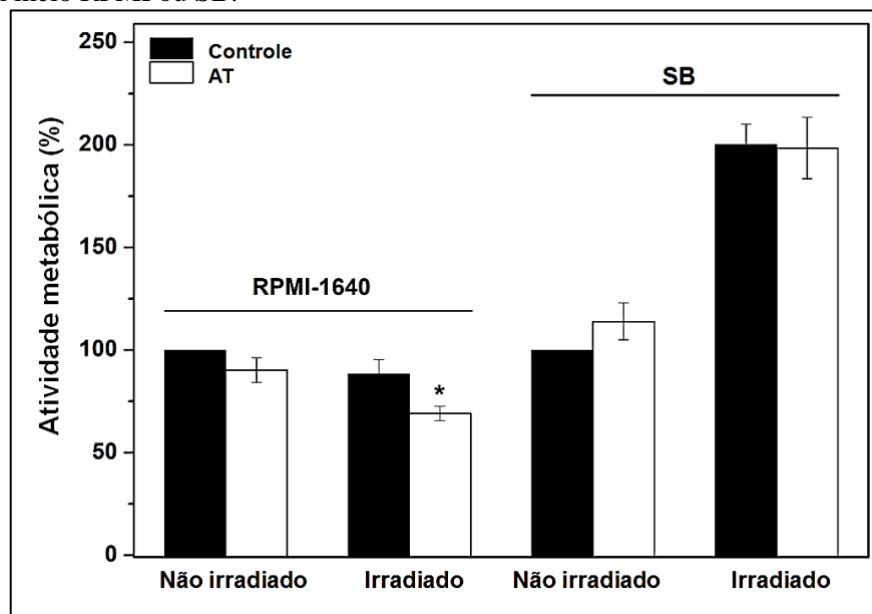
**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. Os biofilmes maduros foram formados em meio de crescimento por 24h e, em seguida, meio fresco foi adicionado por mais 24h. Um biofilme maduro de dupla-espécie formado apenas com RPMI (A); formado com RPMI e depois SB (B); formada apenas com SB (C); e formado com SB e depois RPMI (D), mostrando a diferença morfológica dos biofilmes e a prevalência das espécies de *Candida* em cada um. As setas sólidas pretas indicam leveduras *C. krusei* (leveduras ovais); setas tracejadas pretas indicam leveduras *C. albicans* (leveduras arredondadas); e as setas sólidas amarelas indicam pseudohifas. Barra de escala = 20 µm.

**Fonte:** o autor.

### 5.1.6 Influência do meio de cultura no efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre biofilmes maduros de *Candida spp.*

Foi avaliada a atividade metabólica dos biofilmes maduros dupla-espécie formados na presença de RPMI ou SB e submetidos à TFA com AT (Figura 13). A viabilidade dos biofilmes formados com RPMI foi cerca de 40 % inibida pela TFA, enquanto os biofilmes produzidos com SB não foram modificados pela TFA. Observou-se que utilizando o meio SB, os biofilmes irradiados exibiram um aumento de ~200 % da atividade metabólica quando comparados aos biofilmes não irradiados.

**Figura 13:** Efeito da TFA na atividade metabólica de biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei* cultivados em meio RPMI ou SB.



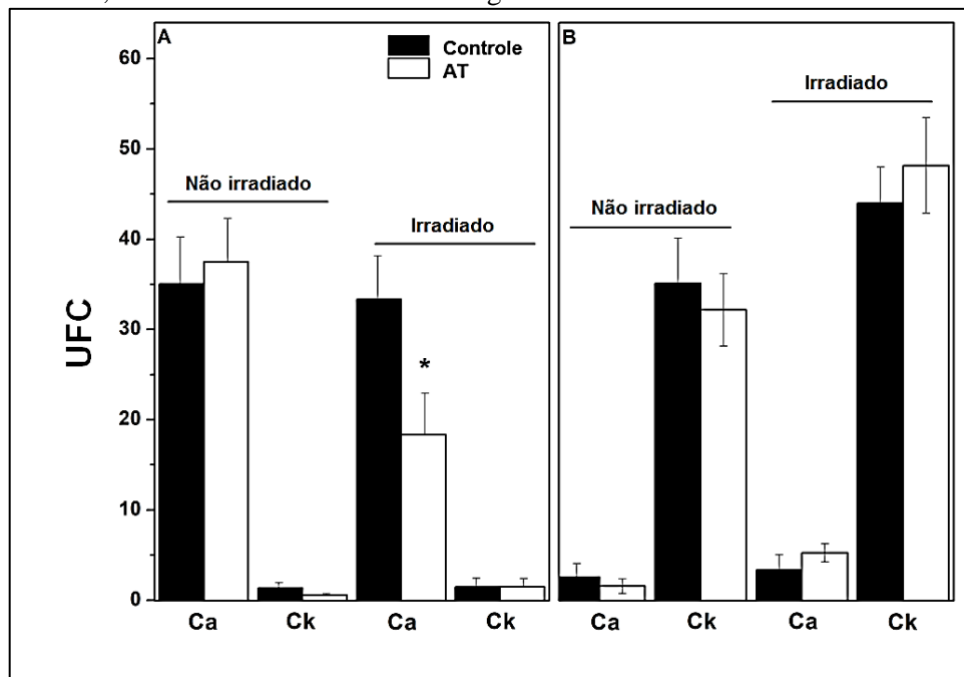
**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A atividade metabólica (%) foi determinada a partir dos biofilmes maduros formados por uma co-cultura de *C. albicans* e *C. krusei* (1:1), na presença de RPMI-1640 ou caldo Sabouraud-dextrose (SB), e submetidos à TFA com AT (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>). Colunas pretas = biofilmes tratados apenas com solução fisiológica estéril (*control*); colunas brancas = biofilmes tratados com o fotossensibilizador Azul de Toluidina (AT); na presença (*irradiado*) ou ausência da luz (*não irradiado*). Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 490 nm (DO<sub>490</sub>) do metabolismo dos biofilmes após a TFA, calculada utilizando o grupo controle (biofilmes não irradiados e na ausência de AT) como 100 % do metabolismo dos biofilmes. Os dados são média ± DP (n = 6).

**Fonte:** o autor.

A atividade metabólica determinada por XTT em biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.*, não demonstrou qual espécie foi modificada pela TFA. Assim, foi realizada uma caracterização da estrutura do biofilme misto após TFA, identificando o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* no meio CHROMagar *Candida* (Figura 14). Foi observada predominância de *C. albicans* em biofilmes formados com RPMI, enquanto predominância de *C. krusei* foi observada utilizando SB. A razão *C. albicans*/*C. krusei* de 26 e 0,1 foi determinada em

biofilmes produzidos usando RPMI e SB, respectivamente. A TFA diminuiu o número de UFCs de *C. albicans* em biofilmes produzidos com RPMI, embora o número de UFCs de *C. krusei* tenha sido baixo e sem diferença significativa, demonstrando a pequena contribuição dessa espécie para o biofilme produzido. Entretanto, os biofilmes formados com SB apresentaram baixa razão *C. albicans*/*C. krusei* e não foram inibidos pela TFA, demonstrando que *C. krusei*, quando presente em biofilmes dupla-espécie, não pode ser modificado pela TFA.

**Figura 14:** Composição dos biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* cultivados em meio RPMI ou SB, submetidos à TFA, identificada no meio CHROMágar Candida.

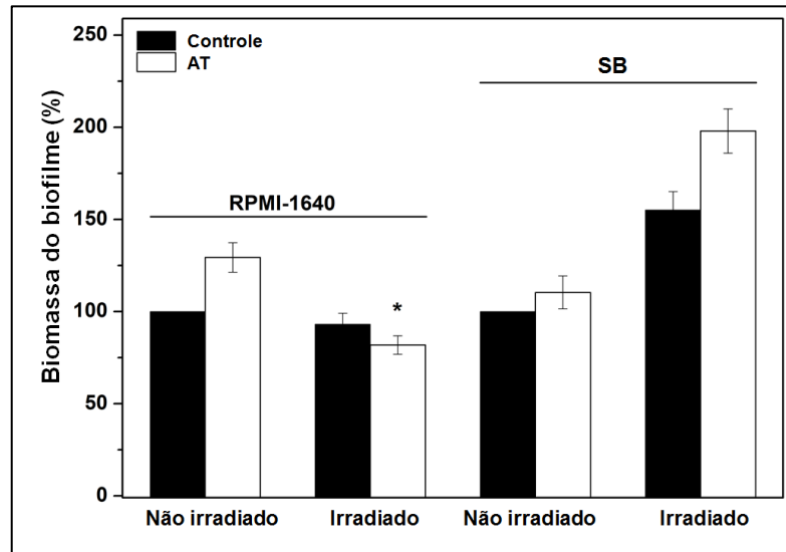


**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. As UFCs foram determinadas em meio CHROMágar Candida após 24h da TFA aplicada aos biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* formados em (A) RPMI ou (B) meio SB. Colunas pretas = biofilmes tratados apenas com solução fisiológica estéril (controle); colunas brancas = biofilmes tratados com AT 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>; na presença (*irradiado*) ou ausência da luz (*não irradiado*). Ca = *C. albicans* e Ck = *C. krusei*. Os dados são média ± DP (n = 6).

**Fonte:** o autor.

Além disso, a quantificação da biomassa desse biofilme foi determinada utilizando o corante Safranina. Foi observada redução na biomassa em biofilmes produzidos com RPMI e tratados com TFA (~20 %), enquanto nenhum efeito foi observado em biofilmes produzidos com SB (Figura 15). Esses dados corroboraram com os resultados da atividade metabólica, demonstrando que a TFA com AT, de fato, afetou apenas biofilmes mistos de *Candida spp.* formados com RPMI e não com meio SB.

**Figura 15:** Efeito da TFA na quantidade de biomassa de biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* cultivados em meio RPMI ou SB.



**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A quantidade de biomassa (%) foi determinada a partir dos biofilmes maduros formados por uma co-cultura de *C. albicans* e *C. krusei* (1:1), na presença de RPMI-1640 ou caldo Sabouraud-dextrose (SB), e submetidos à TFA com AT (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>). Colunas pretas = biofilmes tratados apenas com solução fisiológica estéril (*controle*); colunas brancas = biofilmes tratados com o fotossensibilizador Azul de Toluidina (AT); na presença (*irradiado*) ou ausência da luz (*não irradiado*). Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 492 nm (DO492) do metabolismo dos biofilmes após a TFA, calculada utilizando o grupo controle (biofilmes não irradiados e na ausência de AT) como 100 % da biomassa dos biofilmes. Os dados são média ± DP (n = 6).

**Fonte:** o autor.

Em conjunto, estes resultados demonstraram que o meio utilizado para formar biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei* pode determinar a composição do biofilme, modificando a razão *C. albicans/C. krusei* e, conseqüentemente, o efeito da TFA.

## 5.2 Culturas isoladas de *C. albicans* e *C. krusei* e suas co-culturas

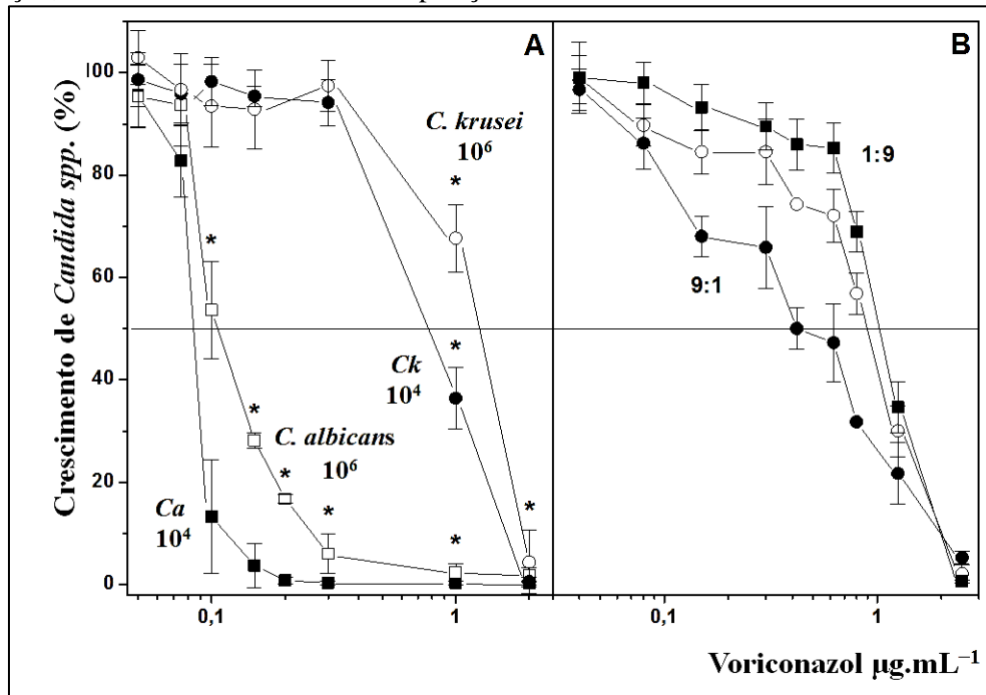
### 5.2.1 Efeito do Voriconazol sobre o crescimento de *Candida spp.*

Foi avaliado o efeito do VOR sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* em diferentes densidades celulares (Figura 16A). O VOR inibiu o crescimento de ambas as espécies de *Candida* utilizadas de maneira dose-dependente da concentração do antifúngico e da densidade celular utilizada. No crescimento de *C. albicans*, 0,1 µg.mL<sup>-1</sup> de VOR promoveu uma inibição de 87 e 47 % nas densidades celulares 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Comparando o efeito do VOR entre as espécies de *Candida*, foi observado que *C. albicans* foi mais sensível que *C. krusei*. Com densidade celular de 10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>, foi visualizada uma inibição de 99 % do crescimento de *C. albicans* na presença de 0,2 µg.mL<sup>-1</sup> de VOR, enquanto o crescimento de *C. krusei* não foi afetado pela mesma concentração do antifúngico. Para

produzir o mesmo efeito em *C. krusei* foi necessária uma concentração de VOR 10 vezes maior ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Efeito semelhante foi observado utilizando uma densidade celular de  $10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ , com  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de VOR promovendo uma inibição de 94 e 3% em *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente. A Figura 16B mostra o efeito do VOR em co-culturas de *Candida spp.* produzidas com diferentes proporções de *C. albicans* e *C. krusei*. Houve alteração significativa no perfil de inibição do crescimento de *Candida*. Utilizando a co-cultura #1 (CC1) realizada em proporção igual (1:1) o perfil de inibição por VOR foi semelhante aos obtidos utilizando apenas *C. krusei*, sendo necessários  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de VOR para produzir uma inibição de 98 % do crescimento de *Candida*. A concentração do antifúngico necessária para inibir 50 % do crescimento foi de  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em *C. albicans*, embora em *C. krusei* e na CC1 (1:1) tenha sido necessário  $\sim 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para obter o mesmo efeito. Uma alteração na razão entre *C. albicans/C. krusei* produziu alterações no perfil de inibição. A co-cultura #2 (CC2) com maior quantidade de *C. albicans* (9:1) foi mais suscetível ao VOR, enquanto a co-cultura #3 (CC3) com menor quantidade de *C. albicans* (1:9) teve mais resistência ao VOR, demonstrando que a presença de *C. krusei* em co-culturas de *Candida spp.* pode diminuir o efeito do VOR sobre o crescimento celular.

Quando comparamos os resultados do efeito do VOR tanto nas culturas de *C. albicans* e *C. krusei* isoladas quanto em suas co-culturas, podemos observar que há concordância entre os resultados. Além disso, os resultados obtidos também demonstraram que as co-culturas de *Candida spp.* podem ser menos suscetíveis ao efeito inibitório VOR.

**Figura 16:** O Voriconazol inibe o crescimento celular de *Candida spp.* de maneira dependente da concentração, da densidade celular e da composição das co-culturas.



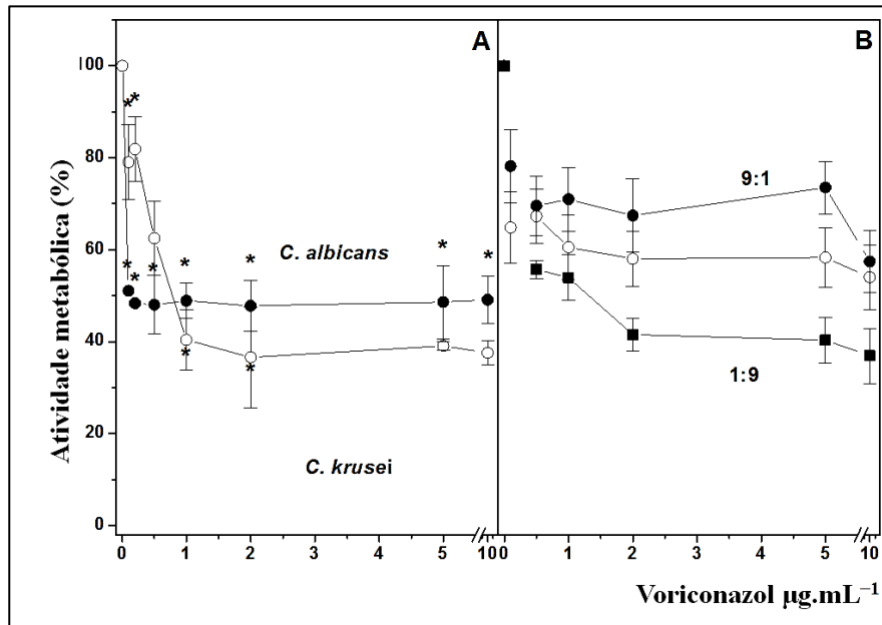
**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A figura mostra as curvas de crescimento (%) de *Candida spp.* na presença de Voriconazol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com (A) diferentes densidades celulares, sendo  $10^4$  células.mL<sup>-1</sup> de (■) *C. albicans* e (●) *C. krusei*, e  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> (□) *C. albicans* e (○) *C. krusei*; e com (B) culturas mistas com diferentes proporções de *C. albicans*/*C. krusei*, sendo (○) 1:1, (●) 9:1 e (■) 1:9. Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 570 nm (DO570) na presença de VOR, da DO medida na ausência de VOR (grupo controle). Os dados são média  $\pm$  DP (n = 6).

**Fonte:** o autor.

### 5.2.2 Efeito do Voriconazol sobre a formação de biofilme de *Candida spp.*

O efeito do VOR sobre a formação de biofilme de espécies de *Candida* é demonstrado na Figura 17. Foi possível observar que *C. albicans* foi mais sensível ao VOR que *C. krusei*, apresentando uma inibição de 50 % na formação de biofilme utilizando  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto uma inibição de ~20 % foi observada em *C. krusei* (Figura 17A). No entanto, em concentrações de VOR superiores a  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a inibição produzida foi mais pronunciada em *C. krusei* do que em *C. albicans*. A maior concentração de VOR utilizada ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) promoveu uma inibição de 50 e 62 % na formação de biofilme por *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente. O perfil de formação de biofilme foi alterado quando a proporção de *C. albicans*/*C. krusei* foi modificada (Figura 17B). Co-culturas com maior proporção de *C. albicans* (9:1) foram mais resistentes ao VOR, enquanto co-culturas com maior proporção de *C. krusei* (1:9) apresentaram maior inibição pelo antifúngico.

**Figura 17:** O Voriconazol inibe a formação de biofilmes de *Candida spp.*, tanto em culturas isoladas quanto em co-culturas.



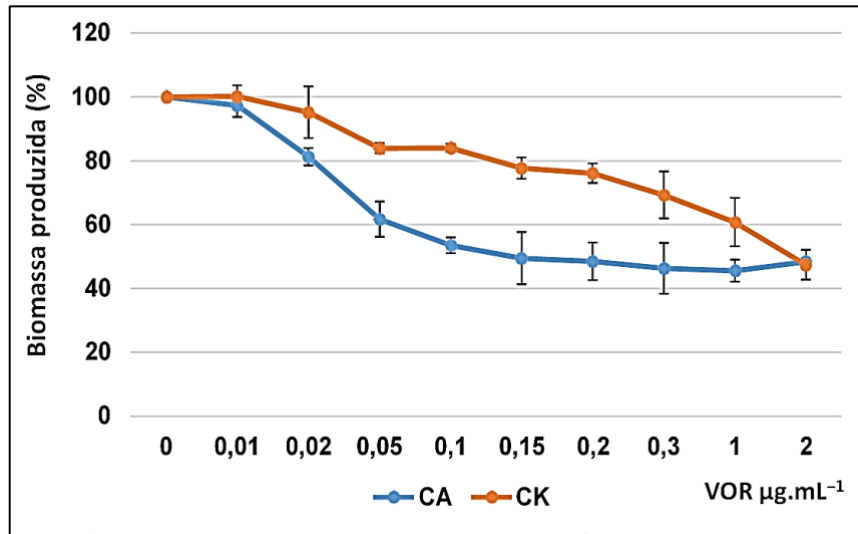
**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A figura mostra as curvas de atividade metabólica (%) dos biofilmes formados por *Candida spp.* na presença de Voriconazol ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em (A) culturas isoladas de (●) *C. albicans* e de (○) *C. krusei*; e em (B) co-culturas com diferentes proporções de *C. albicans/C. krusei*, sendo (○) 1:1, (●) 9:1 e (■) 1:9. Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 490 nm ( $\text{DO}_{490}$ ) na presença de VOR, da DO medida na ausência de VOR (grupo controle). Os dados são média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ).

**Fonte:** o autor.

Esses dados, de certa forma, corroboram com os dados obtidos anteriormente na caracterização, em que os biofilmes mistos produzidos por *C. albicans* e *C. krusei*, demonstraram uma maior suscetibilidade ao VOR por *C. krusei* que por *C. albicans*, tanto em meio RPMI como em meio SB.

O efeito do VOR sobre a quantidade de biomassa produzida pelos biofilmes formados por *C. albicans* e *C. krusei* também foi avaliado (Figura 18). Analisando a quantidade de biomassa produzida, o biofilme de *C. krusei* foi mais resistente ao VOR do que *C. albicans* em todas as concentrações testadas, exceto com VOR  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  onde foram inibidas igualmente. Isso pode ter ocorrido devido aos diferentes tamanhos e morfologia das duas espécies (NIKAWA *et al.*, 1993), em que *C. albicans* é menor que *C. krusei*, portanto a produção de sua biomassa pareceu menor. Além disso, a coloração com Safranina cora toda MEC do biofilme e XTT cora apenas as células com atividade metabólica, e a quantidade de MEC x células metabolicamente ativas podem ser inversamente proporcional nos estágios iniciais de um biofilme (Sadanandan *et al.*, 2022; Pulcrano *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2001). Isso pode sugerir que os biofilmes de *C. krusei* secretaram mais MEC que biofilmes de *C. albicans*, mas são menos metabolicamente ativos na presença de VOR. Por esta razão, houve a diferença entre os perfis inibitórios de *C. albicans* e *C. krusei* nos protocolos de XTT e Safranina.

**Figura 18:** A produção de biomassa de biofilmes de *Candida spp.* é afetada pela presença de Voriconazol.



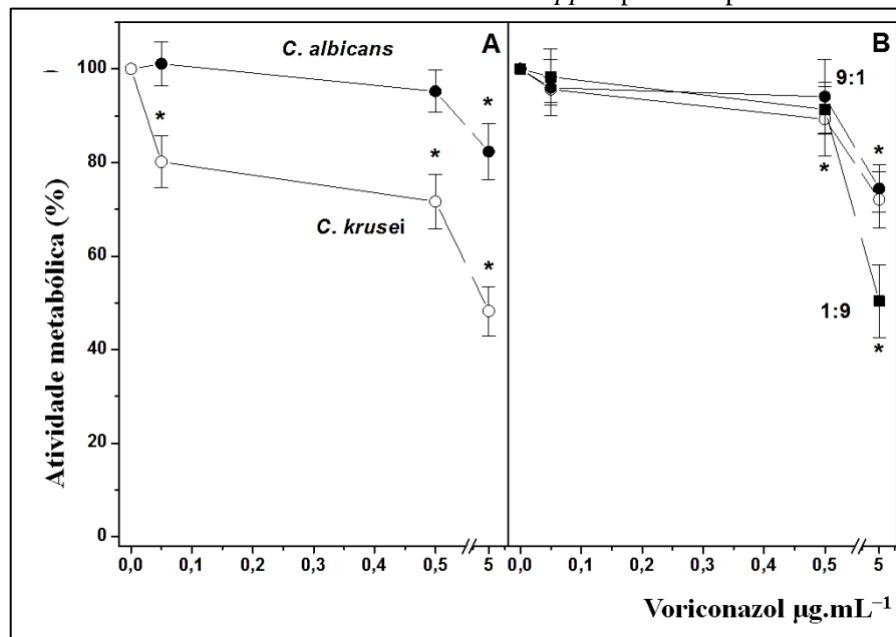
**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A produção de biomassa dos biofilmes de *C. albicans* (CA) e *C. krusei* (CK) foi determinada por meio da coloração com Safranina. Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 492 nm (DO492) na presença de VOR (µg.mL<sup>-1</sup>), da DO medida na ausência de VOR (grupo controle). Os valores são expressos como média ± DP(n=4).

**Fonte:** o autor.

### 5.2.3 Efeito do Voriconazol sobre a adesão de *Candida spp.* em superfície de poliestireno

A fim de compreender a razão pela qual *C. krusei* parece ter sido mais sensível ao VOR durante a formação de biofilme, segundo a atividade metabólica, foi testada a adesão de *Candida spp.* à superfície de poliestireno (Figura 19). Foi possível observar que, de fato, a adesão de *C. krusei* foi mais inibida pelo VOR do que *C. albicans*. Com 5 µg.mL<sup>-1</sup> de VOR houve uma inibição de 18 e 52 % na adesão celular por *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente (Figura 19A). Concentrações de VOR até 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> não inibiram a adesão celular das co-culturas de *Candida*, independente da razão de *C. albicans*/*C. krusei* utilizada (Figura 19B). No entanto, 5 µg.mL<sup>-1</sup> de VOR foi capaz de reduzir a adesão celular em ~27 % nas co-culturas de *Candida spp.* com proporção de (9:1) ou (1:1), enquanto a co-cultura com proporção de (1:9) apresentou diminuição na adesão celular de 50 %. Estes resultados podem sugerir que o VOR poderia inibir a adesão de *C. krusei* e, conseqüentemente, diminuir a sua formação de biofilme.

**Figura 19:** O Voriconazol interfere na adesão de *Candida spp.* à placa de poliestireno.



**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A atividade metabólica (%) foi determinada a partir dos biofilmes formados pós prévia adesão à placa de poliestireno por *Candida spp.* na presença de Voriconazol ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em (A) culturas isoladas de (●) *C. albicans* e de (○) *C. krusei*; e em (B) co-culturas com diferentes proporções de *C. albicans/C. krusei*, sendo (○) 1:1, (●) 9:1 e (■) 1:9. Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 490 nm ( $\text{DO}_{490}$ ) na presença de VOR, da DO medida na ausência de VOR (grupo controle). Os dados são média  $\pm$  DP (n = 6).

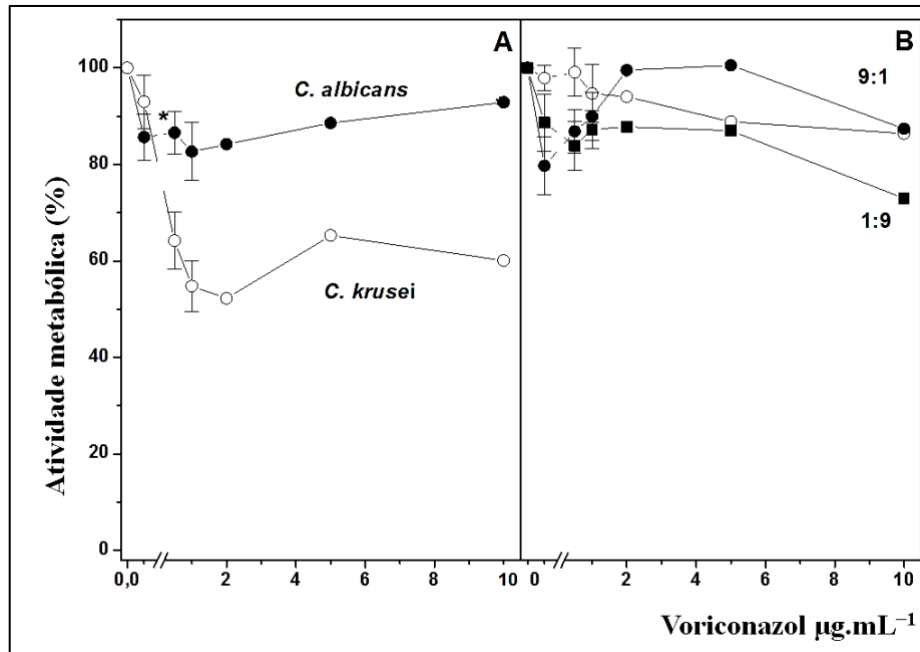
**Fonte:** o autor.

#### 5.2.4 Efeito do Voriconazol sobre o biofilme maduro de *Candida spp.*

O biofilme maduro é considerado mais resistente à ação das drogas por já estar formado e estabelecido, o que dificulta a difusão dos fármacos e, portanto, a erradicação do biofilme. Visando compreender o efeito do antifúngico não apenas no processo de formação de biofilmes de *Candida spp.*, também foi avaliado o efeito do VOR sobre o biofilme maduro de *Candida spp.* (Figura 20). Este biofilme foi formado por 24h na ausência de VOR e, então, foi tratado por mais 24h na presença do antifúngico. Foi possível observar que os biofilmes produzidos por *C. krusei* foram mais afetados pelo VOR do que os biofilmes produzidos por *C. albicans* (Figura 20A). Houve uma inibição de 15 e 48 % no metabolismo dos biofilmes produzidos por *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente, pelo VOR  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nas co-culturas de *Candida spp.*, pouco efeito foi observado por concentrações crescentes de VOR (Figura 20B), não ultrapassando 28 % de inibição nem na maior concentração de VOR utilizada ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A co-cultura #3 (CC3) que contém maior proporção de *C. krusei* (1:9) apresentou maior sensibilidade ao VOR em relação às demais co-culturas. No entanto, ao compararmos o biofilme maduro de *C. krusei* e da CC3, foi possível observar que *C. krusei* foi mais suscetível

ao VOR e que a presença de *C. albicans* na CC3 parece ter tido um efeito de proteção contra a ação do antifúngico.

**Figura 20:** O Voriconazol tem efeito inibitório sobre o metabolismo de biofilmes maduros de *Candida spp.*, em culturas isoladas e em co-culturas.



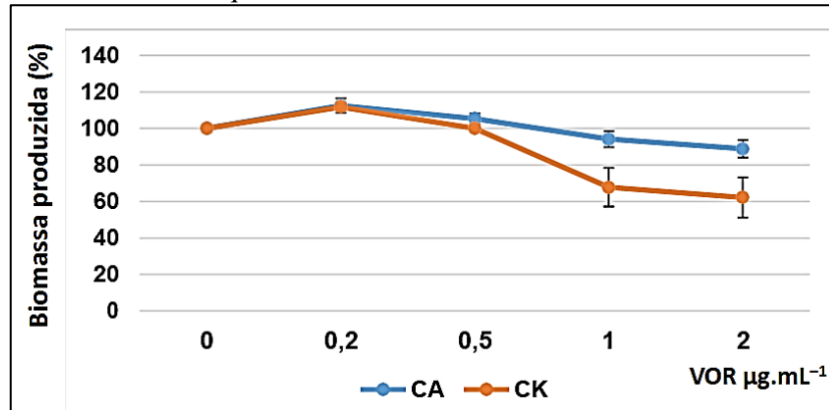
**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A atividade metabólica (%) foi determinada a partir dos biofilmes maduros formados por *Candida spp.* e tratados com Voriconazol ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em (A) culturas isoladas de (●) *C. albicans* e de (○) *C. krusei*; e em (B) co-culturas com diferentes proporções de *C. albicans*/*C. krusei*, sendo (○) 1:1, (●) 9:1 e (■) 1:9. Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 490 nm (DO490) na presença de VOR, da DO medida na ausência de VOR (grupo controle). Os dados são média  $\pm$  DP (n = 6).

**Fonte:** o autor.

Um biofilme de *Candida* formado por 24h ou mais, contém diferentes formas celulares (leveduras e hifas) e presença de MEC bem consolidada (Seneviratne; Jin; Samaranayake, 2008). A biomassa de biofilmes maduros de *C. albicans* e *C. krusei* após serem submetidos ao VOR também foi avaliada (Figura 21). Foi possível observar que o VOR não interferiu na quantidade de biomassa do biofilme maduro de *C. albicans*; entretanto, houve uma redução de cerca de 30 % da quantidade biomassa do biofilme maduro de *C. krusei* na maior concentração de VOR utilizada ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Apesar de protocolos distintos, o efeito do VOR foi semelhante quando avaliado por meio da atividade metabólica e da quantidade de biomassa do biofilme maduro, pois demonstrou que biofilmes de *C. krusei* foram mais suscetíveis que *C. albicans*. Embora a biomassa do biofilme maduro de *C. albicans* não tenha sido afetada pelo VOR, a atividade metabólica desse biofilme sim (Figura 20A). Isso pode ter ocorrido, pois biofilmes maduros (formados com 24h ou mais) podem apresentar células com atividades metabólicas diferentes em cada camada que forma essa estrutura complexa (Seneviratne *et al.*, 2009), além

disso pode haver uma relação inversa entre viabilidade do biofilme e quantidade de biomassa produzida (Sadanandan *et al.*, 2022).

**Figura 21:** O Voriconazol afeta a quantidade de biomassa de biofilmes maduros de *C. krusei*.



**Legenda:** As condições experimentais são descritas em Materiais e Métodos. A produção de biomassa dos biofilmes maduros de *C. albicans* (CA) e *C. krusei* (CK) foi determinada por meio da coloração com Safranina. Os valores são expressos como uma porcentagem da DO determinada a 492 nm (DO<sub>492</sub>) na presença de VOR (µg.mL<sup>-1</sup>), da DO medida na ausência de VOR (grupo controle). Os valores são expressos como média ± DP (n=4).

**Fonte:** o autor.

### 5.2.5 Análise morfológica dos biofilmes de *Candida* spp. submetidos ao Voriconazol

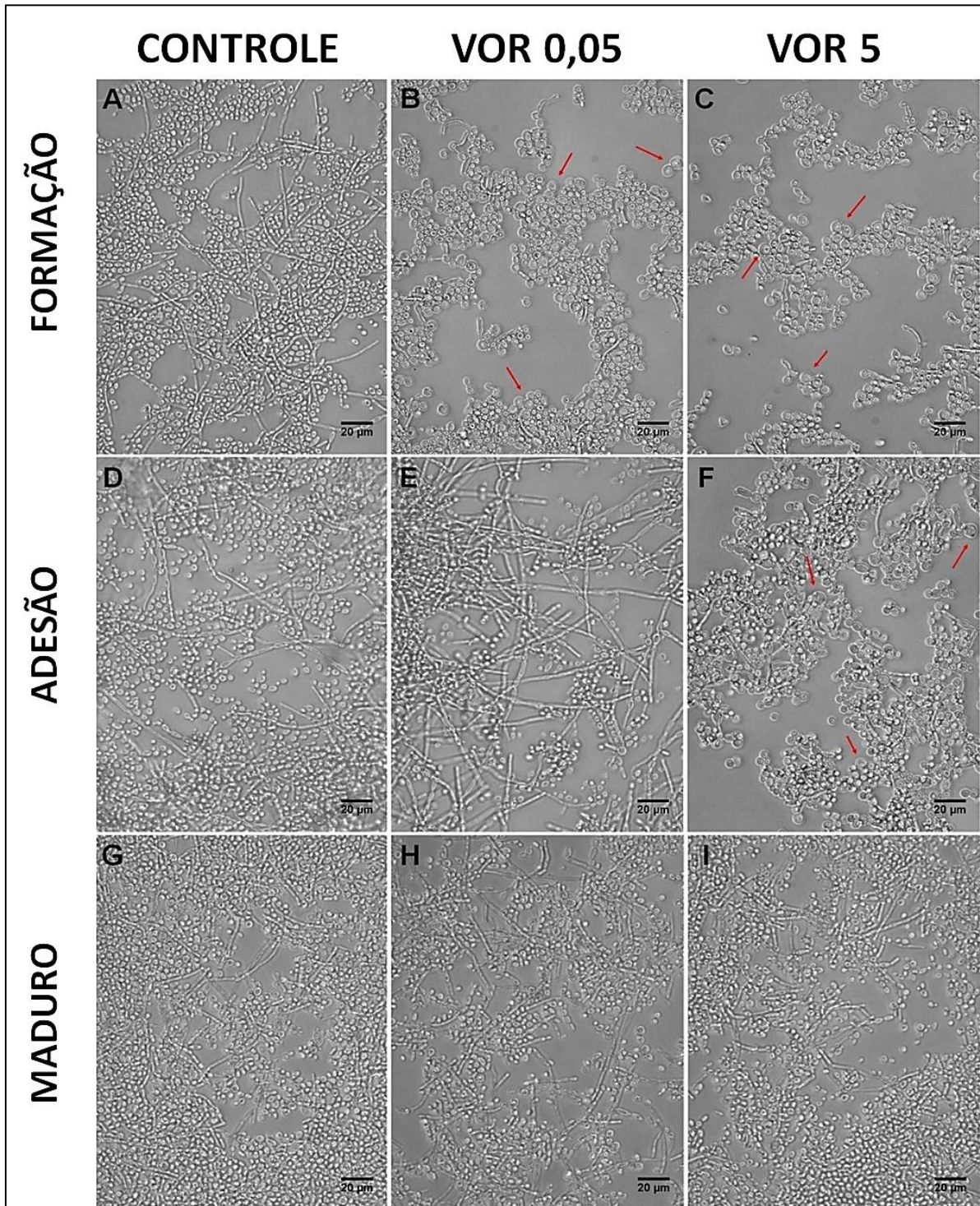
Por meio de fotomicrografias, foram feitas análises qualitativas dos biofilmes tratados com VOR. Pode-se observar as diferenças morfológicas dos biofilmes de *C. albicans* (Figura 22) e *C. krusei* (Figura 23) submetidos ao tratamento com o antifúngico. É possível notar que os biofilmes maduros são mais robustos que os biofilmes produzidos após adesão com VOR; e que estes também possuem mais células que os biofilmes formados em 24 h direto (compare as imagens A, D e G das figuras 22 e 23).

*C. albicans* formou um biofilme com bastante leveduras arredondadas e filamentos, mas de maneira dose-dependente de VOR, o número de células reduziu e a quantidade de elementos hifais presentes no meio também (Figura 22). O mesmo ocorre em biofilmes formados por *C. krusei*, porém de maneira mais acentuada, uma vez que a inibição em biofilmes de *C. krusei* foi maior (Figura 23). Biofilmes de *C. krusei* podem apresentar pseudohifas, mas em menor quantidade, quando comparado com elementos hifais presentes em biofilmes de *C. albicans*. Os biofilmes de *C. albicans*, na presença de uma dose alta de VOR (5 µg.mL<sup>-1</sup>), apresentaram estruturas esféricas três vezes maiores que as leveduras normais com média de 9,453 µm de diâmetro. Sugere-se que são clamidospóros, estruturas características da espécie e que podem estar relacionadas com situações de estresse no ambiente (indicadas com setas vermelhas na Figura 22).

Além disso, foi possível observar também as diferenças morfológicas entre os biofilmes dupla-espécie com diferentes proporções de *C. albicans* e *C. krusei* submetidos ao VOR (Figura 24). Os biofilmes da CC1 (1:1) e CC2 (9:1) apresentam mais leveduras arredondadas e filamentos (Figura 24, A e D, respectivamente), características de biofilmes de *C. albicans*. Enquanto o biofilme de CC3 (1:9) apresenta mais leveduras ovaladas (características de *C. krusei*) e elementos hifais (Figura 24G).

De maneira dose-dependente de VOR, o número de células diminuiu e a quantidade de elementos hifais presentes nos biofilmes também. Visualmente o biofilme de CC3 teve uma redução significativa do número de células (Figura 24 G, H e I). A ausência ou redução de filamentos é evidente ao compararmos os biofilmes controles (Figura 24 A, D e G) com os biofilmes na presença de VOR (Figura 24 B-C, E-F e H-I). Assim como demonstrado na Figura 22, na presença de VOR as leveduras de *C. albicans* apresentam aumento celular, com estruturas esféricas com o triplo do tamanho das células do controle (compare Figura 24, A e B; D e E).

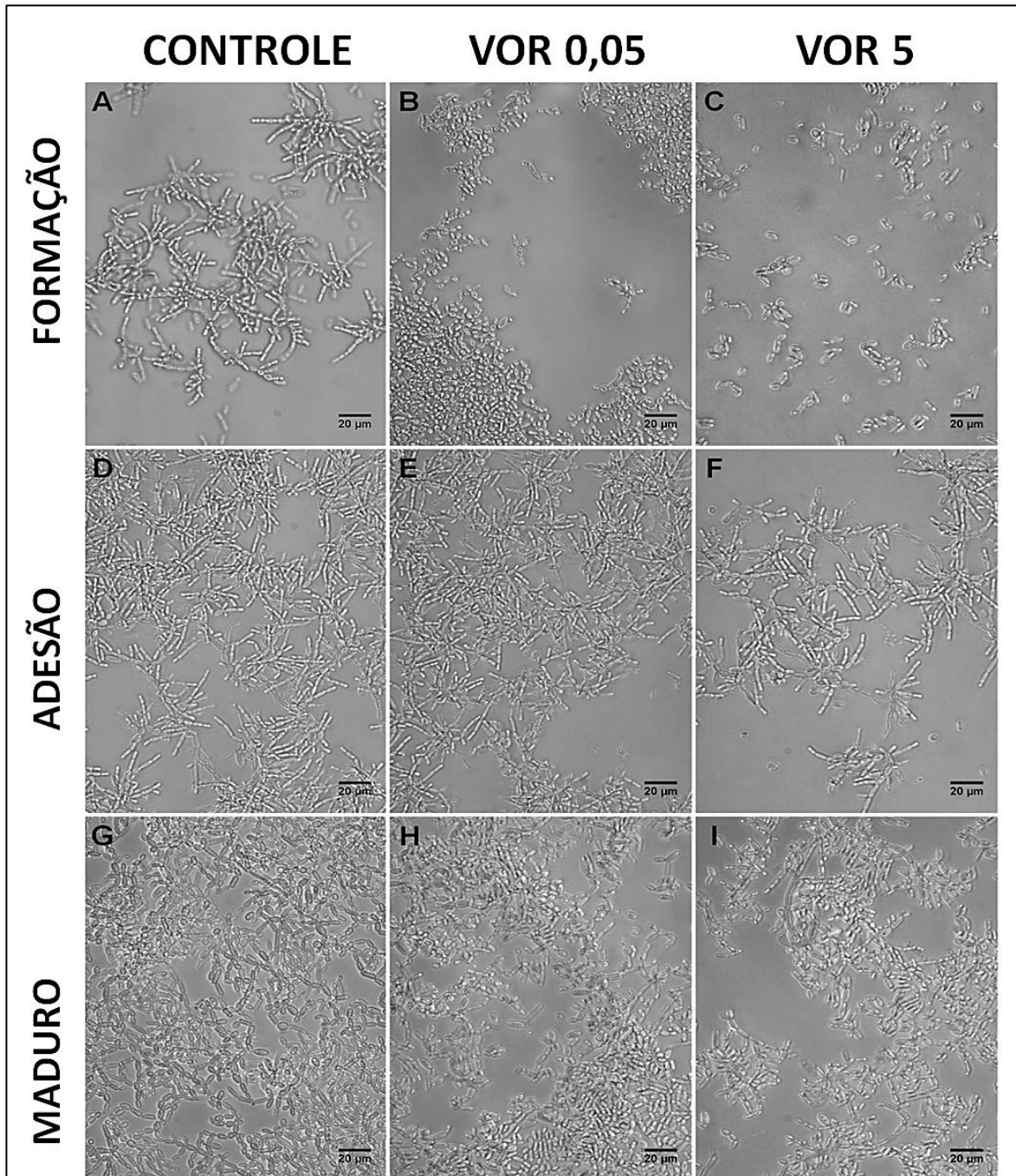
**Figura 22:** Aspectos morfológicos dos diferentes biofilmes produzidos por *C. albicans* após tratamento com Voriconazol.



**Legenda:** Biofilmes produzidos por *C. albicans* na ausência de VOR [Controle (A, D e G)] e tratado com VOR [ $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (B, E e H) e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (C, F e I)]. Biofilmes formados por 24 h com VOR (A-C), biofilmes formados após adesão com VOR (D-F) e biofilmes maduros (G-I). Setas vermelhas indicam possíveis clamidósporos. Barra de escala = 20 µm.

**Fonte:** o autor.

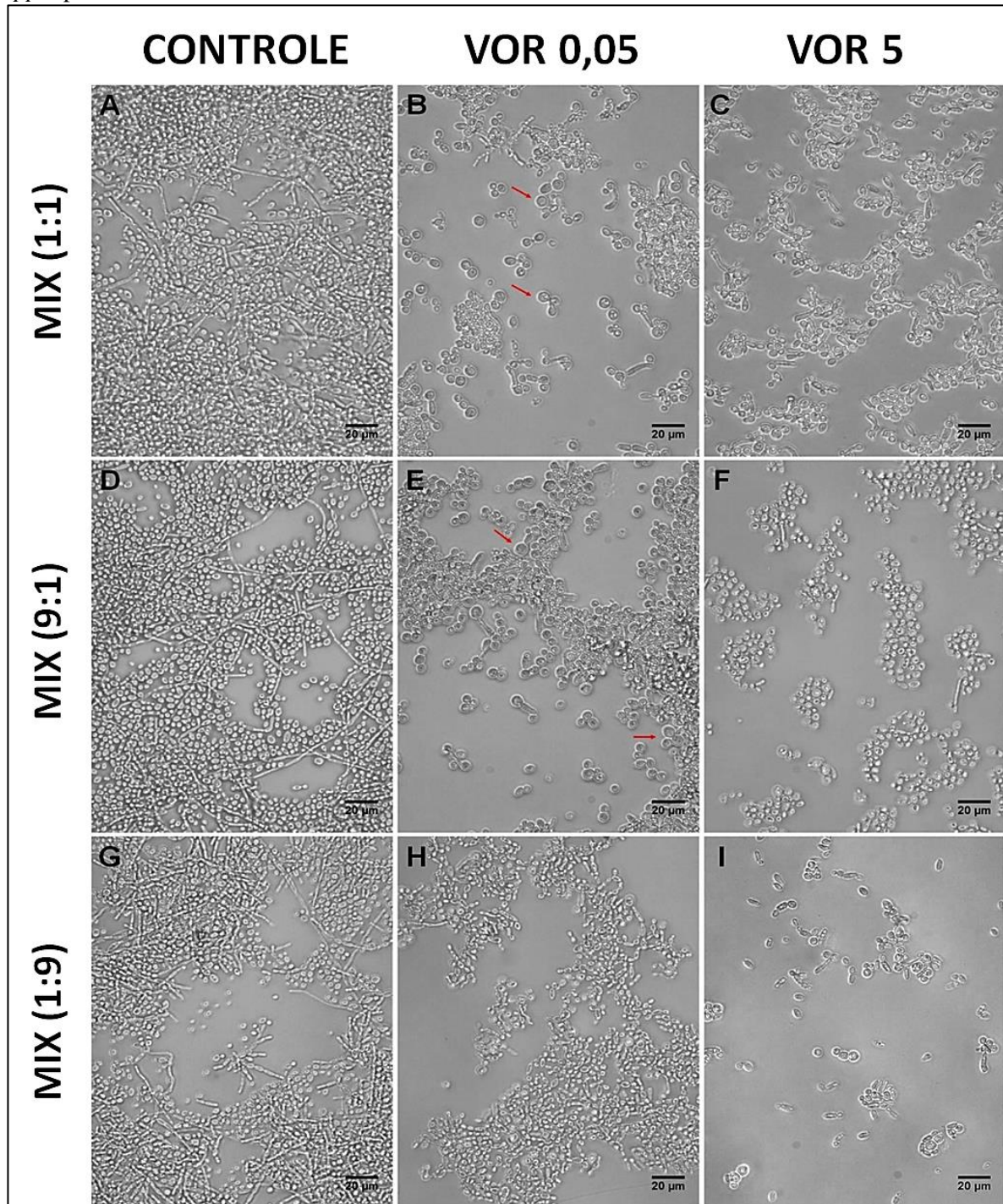
**Figura 23:** Aspectos morfológicos dos diferentes biofilmes produzidos por *C. krusei* após tratamento com Voriconazol.



**Legenda:** Biofilmes produzidos por *C. krusei* na ausência de VOR [Controle (A, D e G)] e tratado com VOR [ $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (B, E e H) e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (C, F e I)]. Biofilmes formados por 24 h com VOR (A-C), biofilmes formados após adesão com VOR (D-F) e biofilmes maduros (G-I). Barra de escala =  $20 \mu\text{m}$ .

**Fonte:** o autor.

**Figura 24:** Aspectos morfológicos dos diferentes biofilmes produzidos por co-culturas de *Candida spp.* após tratamento com Voriconazol.



**Legenda:** Biofilmes produzidos por co-culturas de *Candida spp.* na ausência de VOR [Controle (A, D e G)] e presença de VOR [ $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (B, E e H) e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (C, F e I)]. Biofilme CC1 [proporção 1:1 de CA e CK (A-C)]; biofilme CC2 [proporção 9:1 de CA e CK (D-F)]; biofilme CC3 [proporção 1:9 de CA e CK (G-I)]. Setas vermelhas indicam possíveis clamidósporos. Barra de escala = 20 µm.

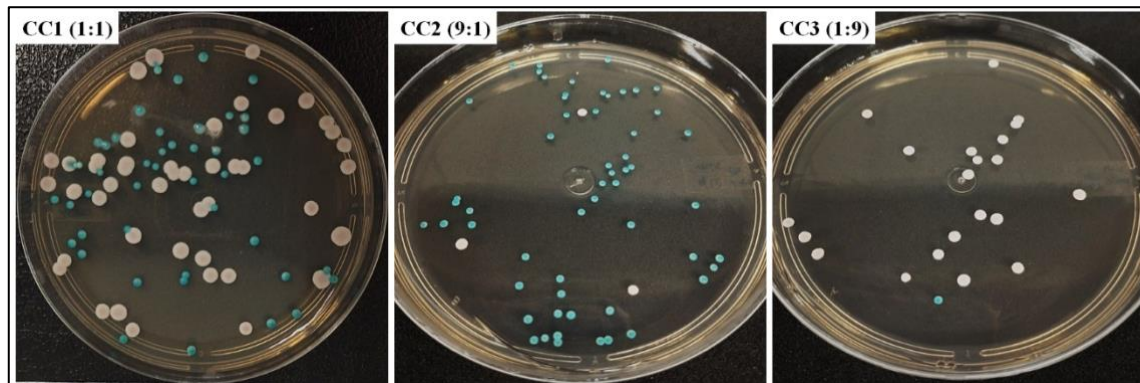
**Fonte:** o autor.

### 5.2.6 Identificação das espécies de *Candida spp.* nas co-culturas submetidas ao Voriconazol

A fim de compreender o efeito do VOR sobre cada espécie dentro dos biofilmes mistos de *Candida spp.*, foi realizada uma caracterização das espécies presentes na estrutura dos biofilmes produzidos (na formação, adesão e biofilme maduro). Esse processo foi realizado identificando o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* em meio CHROMágar Candida. O plaqueamento do conteúdo do biofilme no CHROMágar Candida fornece dados específicos porque as colônias crescem em cores diferentes, evidenciando quais espécies cresceram, sendo colônias verdes para *C. albicans* e colônias esbranquiçadas/rosé para *C. krusei*.

Uma amostra inicial de cada suspensão mista foi plaqueada no meio CHROMágar para identificar se as proporções de cada co-cultura estavam de acordo (Figura 25). Foi possível observar que as culturas iniciais continham a razão de *C. albicans/C. krusei* em concordância com a proporção inicial sugerida para cada co-cultura. Em síntese, as co-culturas apresentaram razão de *C. albicans/C. krusei* em concordância com a proposta inicial das culturas, pois CC1 apresentou a mesma quantidade de cada espécie, CC2 com pelo menos 10 vezes mais *C. albicans*, e CC3 com pelo menos 10 vezes mais *C. krusei*.

**Figura 25:** Identificação de espécies de *Candida* nas co-culturas iniciais com diferentes proporções.



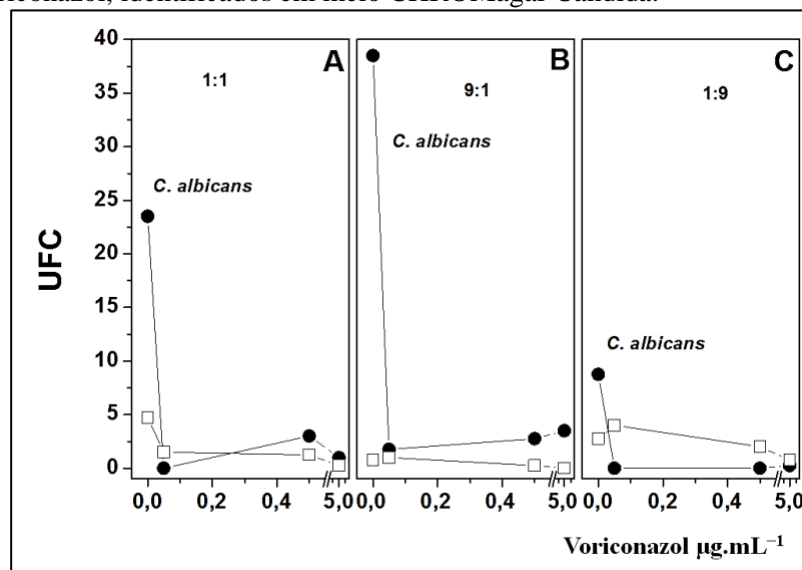
**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. Placas de CHROMágar Candida contendo as colônias de *C. albicans* (em verde) e *C. krusei* (em rosé/branco) das co-culturas iniciais com diferentes proporções antes dos experimentos. As placas de ágar (dimensão 90x15mm) foram mantidas por 48h a 37 °C. O registro foi feito por uma câmera digital de celular.

**Fonte:** o autor.

As espécies também foram identificadas no meio CHROMágar Candida após cada ensaio (formação, adesão e biofilme maduro) com VOR (Figuras 26, 27 e 28). Observou-se que a quantidade de UFCs de *C. albicans*, na presença de VOR, diminuiu em todos os ensaios. Na formação de biofilme, com 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do VOR, houve redução na quantidade de UFCs de 20, 34 e 8 colônias de *C. albicans* nas CC1, CC2 e CC3, respectivamente (Figura 26). Na mesma

concentração de VOR, durante a adesão, CC1, CC2 e CC3 apresentaram, respectivamente, 37, 21 e 5 colônias a menos comparado aos controles (Figura 27). A menor redução das UFCs ocorreu nos biofilmes maduros com valores de 6, 23 e 7 colônias nos biofilmes das CC1, CC2 e CC3, respectivamente (Figura 28). Isso pode ser justificável, uma vez que biofilmes maduros estão estabelecidos e, mesmo na maior concentração do antifúngico ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), há menos efeito inibitório. Nenhuma concentração de VOR utilizada apresentou redução significativa de UFCs de *C. krusei*, uma vez que a quantidade de UFCs foi baixa em todos os ensaios.

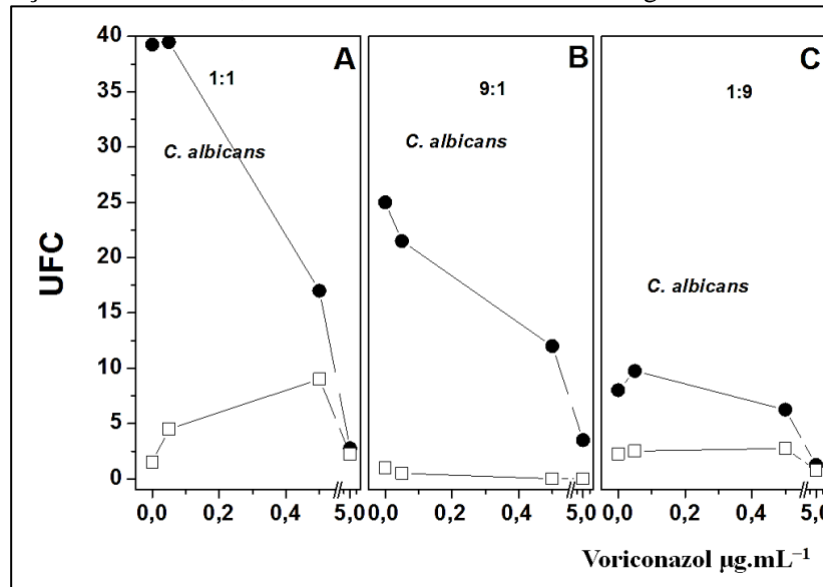
**Figura 26:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos formados na presença de Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de (●) *C. albicans* e (○) *C. krusei* foi determinado após a formação de biofilme dupla-espécie na presença de VOR ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), sendo (A) biofilmes da CC1 com proporção 1:1; (B) biofilmes da CC2 com proporção 9:1; e (C) biofilmes da CC3 com proporção 1:9.

**Fonte:** o autor.

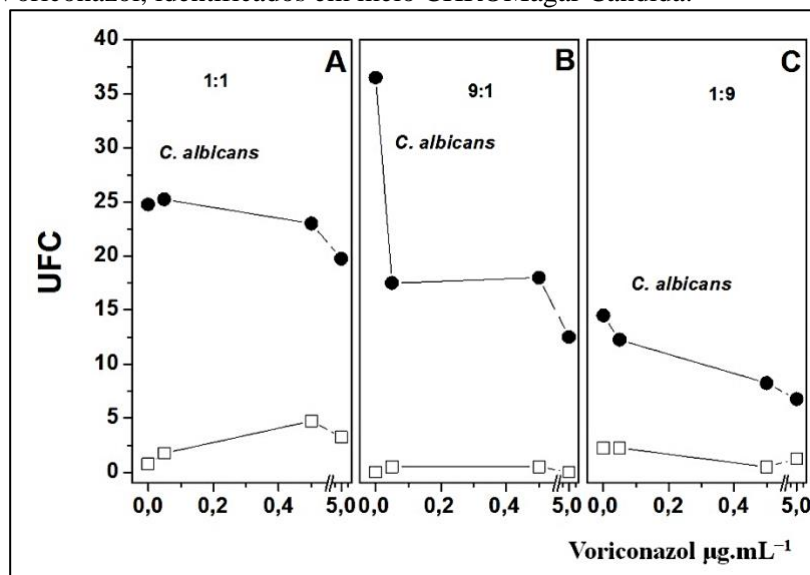
**Figura 27:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes mistos formados após adesão na presença de Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de (●) *C. albicans* e (○) *C. krusei* do biofilme dupla-espécie formado após adesão na presença de VOR ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi determinado, sendo (A) biofilmes da CC1 com proporção 1:1; (B) biofilmes da CC2 com proporção 9:1; e (C) biofilmes da CC3 com proporção de 1:9.

**Fonte:** o autor.

**Figura 28:** Quantificação de UFCs de *C. albicans* e *C. krusei* em biofilmes maduros mistos submetidos ao Voriconazol, identificados em meio CHROMágar Candida.



**Legenda:** Detalhes das condições experimentais descritas na seção Materiais e Métodos. O número de UFCs de (●) *C. albicans* e (○) *C. krusei* do biofilme dupla-espécie maduro submetido ao VOR ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi determinado, sendo (A) biofilmes da CC1 com proporção 1:1; (B) biofilmes da CC2 com proporção 9:1; e (C) biofilmes da CC3 com proporção de 1:9.

**Fonte:** o autor.

Ademais, foi possível identificar que, apesar das proporções iniciais das co-culturas, após todos os ensaios, na ausência ou presença de VOR, a proporção de *C. albicans* foi maior em relação à *C. krusei*, no meio RPMI. Estes resultados confirmaram a importância e necessidade da caracterização desse biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* realizada

anteriormente, com a finalidade de melhorar a compreensão dos resultados e do comportamento de ambas espécies no biofilme.

## 6 DISCUSSÃO

Os fungos dimórficos do gênero *Candida* tem tido notoriedade para a saúde pública devido ao fato de serem as leveduras mais identificadas de isolados clínicos nos casos de infecções fúngicas superficiais ou sistêmicas. Apesar de serem fungos comensais da microbiota humana, sua patogenicidade está relacionada ao oportunismo, quando o hospedeiro está imunossuprimido. Dentre as espécies, se destacam *Candida albicans* e *Candida krusei*, sendo *C. albicans* mais comum e recorrente nos casos de infecções nosocomiais e *C. krusei* menos recorrente (2,8 %), porém preocupante devido a sua resistência aos antifúngicos de escolha nos tratamentos. Apesar de não ser o principal antifúngico de escolha nos tratamentos, o Voriconazol tem ação amplo-espectro e é amplamente utilizado contra infecções por fungos resistentes ao fluconazol e anfotericina-b, especialmente espécies de *Candida* e *Aspergillus*.

Kumar *et al.* (2018) testaram diversas drogas em variadas espécies isoladas de *Candida spp.* e concluíram que o VOR foi o antifúngico mais indicado contra *C. albicans* e espécies não-*albicans*. Marak e Dhanashree (2018) testaram algumas drogas, incluindo VOR, sobre algumas espécies de *Candida* e demonstraram que todas elas, inclusive *C. albicans* e *C. krusei*, foram cerca de 82 % suscetíveis ao fármaco. Outros autores também demonstraram a eficácia do uso de VOR em *Candida spp.* (Güzel *et al.*, 2013; Marak; Dhanashree, 2018; Al Jalali *et al.*, 2019). Nossos dados demonstraram que as espécies *C. albicans* e *C. krusei* foram suscetíveis ao VOR de maneira dose-dependente da concentração do antifúngico, da densidade celular utilizada e do estágio de desenvolvimento do biofilme. Além disso, as concentrações utilizadas estão de acordo com os dados fornecidos pelo EUCAST (2022) e CLSI (2022), ainda que haja mais informações sobre a dosagem de VOR para *C. albicans* que para *C. krusei*.

Analisamos o efeito de diferentes concentrações de VOR sobre o crescimento de *Candida spp.* e, também, sobre seu aspecto de virulência mais importante: a formação de biofilme. Células planctônicas de *C. albicans* se mostraram mais suscetíveis ao VOR que *C. krusei*. Esses resultados corroboram com dados de crescimento de ambas espécies com o mesmo antifúngico (Madhavan *et al.*, 2010; AlJalali *et al.*, 2019), com outros azóis (Madhavan *et al.*, 2010; Denis *et al.*, 2018) e com outros compostos (Rosseti *et al.*, 2011; Rosseti; Rocha; Costa, 2015; Amorim *et al.*, 2018; Siqueira *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021b; 2022); que mostram que para inibir o crescimento de *C. krusei* é necessário doses mais altas que para *C. albicans*. No entanto, em nosso trabalho, esse comportamento não foi observado para os biofilmes. Enquanto alguns autores utilizam doses muito mais altas para afetar a viabilidade

de biofilmes de *C. krusei* comparado aos biofilmes de *C. albicans* (Rosseti *et al.*, 2011, 2015; Amorim *et al.*, 2018; Siqueira *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021b; 2022), nossos dados demonstraram o oposto. Biofilmes de *C. krusei* foram mais suscetíveis ao VOR que biofilmes de *C. albicans*.

Alguns autores afirmam que a habilidade formar biofilmes é maior para espécies de *Candida* não-*albicans* (NAC), especialmente para os patógenos emergentes, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (Shin *et al.*, 2002; Kumar; Menon, 2006; Seneviratne; Jin; Samaranyake, 2008). Em contrapartida, alguns autores relatam que biofilmes de *C. albicans* são mais fortes que de *C. krusei* (Marak; Dhanashree, 2018; Ponde *et al.*, 2021; Sachivkina; Podoprigora; Bokov, 2021), principalmente pelo fato das hifas de *C. albicans* colonizarem e penetrarem fundo nos tecidos do hospedeiro de maneira mais eficiente que as pseudohifas de *C. krusei* (Samarayake *et al.*, 1998; Jamiu *et al.*, 2021). Nossos dados sugerem que os biofilmes formados por *C. albicans* foram mais fortes e resistentes ao VOR que biofilmes de *C. krusei*.

Analisamos o efeito do VOR sobre a formação do biofilme (biofilmes formados por 24h) e sobre o biofilme maduro (formados por 48h), e podemos perceber que a droga agiu de maneira dose-dependente da concentração do VOR e os biofilmes maduros foram menos afetados que biofilmes jovens. Segundo Chandra *et al.* (2001), a progressão da resistência às drogas em biofilmes de *C. albicans* está associada ao aumento concomitante da atividade metabólica dos biofilmes em desenvolvimento. Monteiro *et al.* (2011) observaram que o efeito de nanopartículas de prata em biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* foi maior em biofilmes jovens (formados por 24h) que em biofilmes maduros (formados por 48h). Isso pode indicar que a diminuição observada na suscetibilidade ao VOR foi um reflexo de uma menor atividade metabólica das células em biofilmes mais maduros.

Quando analisamos a formação de biofilme quanto à atividade metabólica (por XTT), nossos resultados demonstraram que biofilmes formados por *C. krusei* foram mais suscetíveis ao VOR que biofilmes de *C. albicans*. Entretanto, ao analisarmos os biofilmes por meio da biomassa produzida (coloração com Safranina), o resultado demonstrou o oposto. Sadanandan *et al.* (2022) analisaram fatores importantes para a formação de biofilmes de *Candida glabrata* em superfícies abióticas e utilizaram diversos métodos para analisar e quantificar esses biofilmes, a fim de elaborarem um modelo matemático para simulações de condições adversas para formar biofilmes e estudá-los. Assim como em nossos resultados, eles observaram que para culturas onde a viabilidade celular foi alta (por XTT), a biomassa produzida foi baixa, e vice-versa. Apesar de Sadanandan *et al.* (2022) terem utilizado a coloração com Cristal Violeta (CV) para quantificar a biomassa, os resultados são semelhantes aos que encontramos

em nosso trabalho. Aliás, ambos protocolos são semelhantes, apenas utilizam corantes diferentes; porém, há estudos que relatam que a Safranina pode substituir o uso do CV, além de ser considerado menos tóxico para a célula e possuir maior reprodutibilidade nos experimentos (Ommen; Zobek; Meyer, 2017). Pulcrano *et al.* (2012) também notaram uma distinção entre os resultados do ensaio XTT e a coloração com cristal violeta, porque o CV corou toda a massa do biofilme, incluindo as células fúngicas e matriz extracelular, enquanto o XTT revelou apenas células metabolicamente ativas. Mesmo com resultados de viabilidade e biomassa distintos, fomos capazes de identificar que biofilmes de *C. krusei* eram realmente mais suscetíveis ao VOR que biofilmes de *C. albicans* ao analisarmos qualitativamente a composição desses biofilmes, por microscopia óptica. Houve redução significativa do número de células em ambos biofilmes (*C. albicans* e *C. krusei*), sendo mais expressiva para biofilmes de *C. krusei* quando comparado com a redução ocorrida em *C. albicans*. Ainda assim, observou-se que nos biofilmes de *C. albicans* ocorreu perda dos elementos hifais e aumento celular ou presença de clamidósporos, que podem aparecer sob estresse, demonstrando que biofilmes de *C. albicans* foram menos suscetíveis ao VOR, mas não resistentes.

Ao analisarmos a morfologia dos biofilmes de *C. albicans*, foi possível identificar a presença de clamidospóros quando as células foram tratadas com VOR. *Candida albicans* pode apresentar células como leveduras, pseudohifas e hifas, além de uma estrutura chamada clamidospóro que é característica de situações de estresse e ambientes desfavoráveis, porém não se tem mais informações sobre ela. Essas estruturas são arredondadas, com parede celular espessa e bem definida, e podem medir de 7-13 µm de diâmetro (Sachivkina; Podoprigora; Bokov, 2021; Nasution, 2013; Whiteway; Bachewich, 2007).

É conhecida a capacidade das leveduras de se disseminarem e invadirem os tecidos do hospedeiro causando infecções, principalmente por sua capacidade de formar biofilmes e aderir aos mais diversos substratos. *Candida spp.* é capaz de suportar condições adversas do meio e se adaptar para conseguir se instalar e infectar o hospedeiro com sucesso, e isso é uma característica de sua virulência (Serrano-Fujarte, 2015; Tan *et al.*, 2016; Porfirio *et al.*, 2017; Scorzoni *et al.*, 2017; Lohse *et al.*, 2018; Barros *et al.*, 2020; Konecna *et al.*, 2021; Ponde *et al.*, 2021). Por isso, vários fatores devem ser considerados para o estudo da formação de biofilmes como, por exemplo, o material do substrato (biótico e abiótico), o meio de nutrição, a composição celular e a competição do meio (Seneviratne; Jin; Samaranyake, 2008; Sadanandan *et al.*, 2022).

Para caracterizarmos o biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* quanto à influência de alguns aspectos para a composição final deste biofilme, utilizamos os meios RPMI-1640 e

Sabouraud-dextrose (SB), culturas de *C. albicans* e *C. krusei*, e diferentes métodos de adesão das células ao substrato. Na literatura (Hosida *et al.*, 2017; Porfírio *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017, 2016; Weerasekera *et al.*, 2016), ambos meios de cultura são frequentemente utilizados para cultivo de *Candida spp.* com diferentes finalidades (crescimento celular, estudo de biofilmes, etc); por essa razão foram os meios escolhidos para esta caracterização. Observamos que os meios RPMI e SB favoreceram mais o desenvolvimento de *C. albicans* e *C. krusei*, respectivamente, nos biofilmes mistos. Além disso, quando houve adesão por 90 min das coculturas de *Candida spp.* à placa, a razão entre *C. albicans/C. krusei* diminuiu (em meio RPMI), sugerindo que esse período de pré-adesão beneficiou o desenvolvimento do biofilme de *C. krusei*.

O meio RPMI-1640 possui pouca glicose, é rico em aminoácidos, vitaminas e sais orgânicos, e assemelha-se com os fluidos humanos (Weerasekera *et al.*, 2016). É de conhecimento comum que a escolha do meio para o crescimento e formação de biofilmes é de extrema importância. Weerasekera *et al.* (2016) realizaram testes com células planctônicas e biofilmes utilizando os meios RPMI-1640 e Sabouraud-dextrose (SB). Eles identificaram que o meio SB era melhor para ensaios de crescimento celular, e RPMI formava melhores biofilmes. Esses dados corroboram com os nossos resultados e, além disso, os nossos biofilmes dupla-espécie formados com RPMI eram mais espessos que os biofilmes formados com meio SB, além do número de UFCs ser maior até mesmo nos controles. Sugere-se que por se assemelhar aos fluidos humanos, o meio RPMI estimule a transição morfogênica de *Candida spp.*, formando um biofilme mais heterogêneo e mais forte (Porfírio *et al.*, 2017). Por outro lado, a preferência de *C. krusei* pelo meio SB poder ser justificada por Tan *et al.* (2016, 2017) que demonstraram que essa espécie prefere outros meios ao RPMI-1640, como também por Porfírio *et al.* (2017) que identificaram que *C. krusei* foi capaz de formar biofilme em meio SB ao invés de RPMI.

Parahitiyawa *et al.* (2006) demonstraram que a secreção de MEC por *C. krusei* é maior que por *C. albicans*, e sugeriram que o biofilme de *C. krusei* pode ser mais consistente quando há mais secreção de MEC, pois ela é responsável pela união entre célula-substrato e célula-célula. A matriz extracelular é secretada, principalmente, nas primeiras fases do desenvolvimento do biofilme (adesão e proliferação) (Barros *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2020; Ponde *et al.*, 2021), o que poderia explicar nossos resultados. Ademais, leveduras de *C. krusei* tem 5x mais hidrofobicidade que *C. albicans* (Samaranayake; Samaranayake, 1994), portanto sua adesão às superfícies abióticas é mais forte (Parahitiyawa *et al.*, 2006; Jamiu *et al.*, 2021).

Em biofilmes polimicrobianos podem ocorrer interações sinérgicas ou antagonistas entre as espécies (Thein; Samaranayake; Samaranayake, 2007; Santos *et al.*, 2016; Jamiu *et al.*, 2021). Barros *et al.* (2017) mostraram que em biofilmes mistos de *C. krusei* e *C. albicans*, *C. krusei* pode suprimir e inibir a outra espécie devido à adesão competitiva, competição por nutrientes e espaço e/ou devido à síntese de substâncias químicas inibitórias e mensageiros moleculares por *C. krusei*. Santos *et al.* (2016) analisaram o comportamento dos biofilmes mistos de *C. albicans* e espécies NAC, e observaram que *C. krusei* inibiu o crescimento e a formação de filamentos de *C. albicans*. Nossos resultados demonstraram que nos biofilmes mistos formados em meio RPMI-1640, *C. krusei* foi suprimida por *C. albicans*, diferentemente dos casos citados na literatura. Entretanto, ao analisarmos a morfologia desses biofilmes mistos e compará-la com os biofilmes de cada espécie sozinha (ambos controles), há uma redução na quantidade de hifas de *C. albicans* no biofilme quando há a presença de *C. krusei*.

Foram utilizadas diferentes proporções das co-culturas de *Candida spp.* nos biofilmes mistos, contendo quantidades iguais de *C. albicans* e *C. krusei*, dez vezes mais *C. albicans*, ou dez vezes mais *C. krusei*. Podemos observar que os biofilmes mistos foram menos suscetíveis ao VOR, quando comparados com os biofilmes de uma só espécie. Pathak e seus colaboradores (2012) analisaram o comportamento de biofilmes mistos de *Candida spp.* e a influência que cada espécie poderia ter sobre a outra; fizeram biofilmes dupla, tripla e múltipla espécies. Eles observaram que a presença de *C. albicans* nos biofilmes mistos favorecia a aderência ao substrato para outras espécies de *Candida*. Do mesmo modo, o biofilme maduro misto (1:9) de *C. albicans/C. krusei* foi mais resistente ao VOR que o biofilme maduro apenas de *C. krusei*.

Outro resultado interessante foi a formação de películas acima da superfície do meio quando SB foi utilizado e somente quando *C. krusei* estava presente. Esse fato também foi descrito por Fleischmann e Sripuntanagoon (2011) e Jamiu *et al.* (2021). Notou-se também que esta película era mais fina sempre que VOR era adicionado ao meio. Este resultado específico poderia explicar porque observamos um número menor de UFCs de *C. krusei* nas placas CHROMágar. Al Jalali *et al.* (2019) avaliaram a atividade in vitro de VOR e anfotericina B em cepas de três fungos diferentes, incluindo *C. albicans* e *C. krusei*, bem como seu crescimento em dois meios distintos. Observou-se que, de forma geral, ambos os fármacos exerceram atividade sobre os microrganismos testados. No entanto, o efeito inibitório sobre *C. krusei* quando observado em SB foi maior em comparação com *C. albicans* nas mesmas condições (Al Jalali *et al.*, 2019). Este resultado corrobora com as descobertas

aqui expostas, onde foi observado que *C. krusei* respondeu de forma diferente de *C. albicans* quando o biofilme misto foi submetido ao VOR. As UFC contadas no meio CHROMágar auxiliaram na identificação de que, apesar de ser menos suscetível a certos azóis e de ser intrinsecamente resistente ao fluconazol, *C. krusei* apresentou menor número de UFCs que *C. albicans*, mesmo no meio SB em que a razão *C. krusei/C. albicans* era maior. Marak e Dhanashree (2018) observaram resultados semelhantes em seu estudo, que avaliou a suscetibilidade e produção de biofilme de diferentes isolados clínicos de *Candida spp.* mediante três medicamentos antifúngicos, incluindo VOR. Eles sugeriram que *C. albicans* produz melhores biofilmes do que outras espécies do gênero, como *C. krusei*, por exemplo. Apenas 17,64 % das cepas de *C. krusei* foram resistentes ao VOR, enquanto para *C. albicans* o resultado foi superior a 40 %. Observou-se também que *C. albicans* pareceu mais resistente aos efeitos do VOR mesmo em biofilmes maduros de duas espécies.

Há trabalhos que demonstram a morfologia de biofilmes polimicrobianos de *Candida spp.* (com bactérias também) por meio de fotomicrografias, mas são escassos (Liu *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2019; Hernandez-Cuellar *et al.*, 2022). Em nosso trabalho, além de demonstrar a morfologia dos biofilmes mistos por microscopia óptica, também demonstramos a alteração na morfologia decorrente da influência do meio de cultura e da proporção das co-culturas de *Candida spp.*

Para a caracterização do biofilme dupla-espécie de *Candida spp.*, além da análise morfológica, foi feita também a diferenciação de cada espécie (*C. albicans* e *C. krusei*) por meio de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em meio CHROMágar Candida. Esse meio é utilizado para diferenciação de espécies de *Candida*, onde cada espécie apresenta-se com uma coloração específica ao degradar o substrato cromogênico (Odds; Bernaerts, 1994). A análise dos nossos biofilmes mistos plaqueados em meio CHROMágar possibilitou a identificação exata da quantidade de cada espécie nos biofilmes e, com isso, pudemos identificar que o meio poderia regular as interações entre *Candida spp.*, alterando a taxa de *C. albicans/C. krusei* e, conseqüentemente, o efeito inibitório dos métodos antifúngicos a serem utilizados.

Tem sido demonstrado que células de *C. albicans* e *C. krusei* submetidas à TFA, utilizando azul de toluidina (AT), apresentaram tanto inibição do crescimento das células planctônicas, como também, inibição da capacidade de formação de biofilme (Rosseti; Chagas; Costa, 2014; Silva *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2018). Recentemente, o efeito da TFA com AT foi, pela primeira vez, estudado em biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei*; em ambas fases dos biofilmes, jovens (formados por 24h) e maduros (formados por

48h), houve inibição de 50 e 30 %, respectivamente, demonstrando o potencial inibitório da TFA com AT em biofilmes mistos de *Candida spp.* (Rodrigues; Passos; Costa, 2023). Rodrigues, Passos e Costa (2023) verificaram, em meio CHROMágar, que biofilmes dupla-espécie com igual proporção inicialmente, após formados em meio RPMI, apresentavam maior razão de *C. albicans/C. krusei* e que o efeito inibitório da TFA foi devido à redução das UFCs de *C. albicans* no meio. Da mesma maneira, esses dados corroboram com os resultados apresentados aqui (Passos *et al.*, 2023).

Neste trabalho foi evidenciada pela primeira vez a influência do meio de cultura em biofilmes mistos de *C. albicans* e *C. krusei* submetidos à TFA com AT e a relação com a eficácia do tratamento. Assim como Rodrigues, Passos e Costa (2023), houve inibição dos biofilmes dupla-espécie formados no meio RPMI associada, principalmente, à redução das UFCs da espécie *C. albicans* no meio. Além disso, também foi demonstrado que a razão de *C. albicans/C. krusei* é maior no meio RPMI e o inverso ocorre no meio SB, ainda que as culturas iniciem com igual proporção (1:1). No entanto, após a TFA com AT não houve inibição do biofilme dupla-espécie de *Candida* formado em meio SB e, ademais, houve aumento da atividade metabólica, da biomassa e das UFCs de ambas espécies após a irradiação. Não há na literatura explicação para tal resultado, bem como não há correlações a serem feitas. Acredita-se que a composição do meio possa beneficiar o desenvolvimento de uma das espécies, bem como sua transição morfogênica; ou a composição do meio possa interferir na afinidade do fotossensibilizador utilizado; ou a irradiação com LED, no meio SB, possa ter beneficiado as células de alguma maneira, atuando como fotobiomodulação e estimulando o crescimento.

Por meio dos nossos dados, pela primeira vez, foi demonstrado que o efeito da TFA em biofilmes dupla-espécie de *C. albicans* e *C. krusei* pode ser determinado pela razão *C. albicans/C. krusei*, além de ser influenciado pela escolha do meio de crescimento. Em conjunto, esses resultados demonstraram também a importância da caracterização de biofilmes dupla-espécie, especificamente de *Candida spp.*, pois podem apresentar comportamentos diferentes de biofilmes de uma só espécie mediante diversos métodos de tratamento e avaliação.

## 7 CONCLUSÃO

A caracterização do biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* foi essencial para evidenciar alguns fatores importantes que podem alterar o produto final do biofilme misto em um estudo. A escolha do meio de cultivo, a realização da pré-adesão e a ordem de adição das espécies ao biofilme foram determinantes para os estudos, pois demonstraram que podem interferir na composição final do biofilme misto de *C. albicans/C. krusei* e, ao mesmo tempo, no resultado das terapias antifúngicas empregadas.

As espécies *C. albicans* e *C. krusei* apresentaram maior afinidade e melhor desenvolvimento do biofilme na presença dos meios RPMI e SB, respectivamente. A escolha do meio também foi relacionada a eficácia da TFA, uma vez que na presença do RPMI houve inibição do biofilme misto e o biofilme formado em meio SB não foi afetado pela terapia. A terapia antifúngica com VOR demonstrou ser efetiva tanto em monoculturas como em co-culturas de *Candida spp.*, inibindo o crescimento e biofilmes em diferentes estágios de maturação de maneira dose-dependente. Embora ambas espécies tenham sido suscetíveis ao VOR, *C. krusei* foi mais sensível ao seu efeito. Ademais, VOR foi capaz de alterar o perfil morfológico dos biofilmes que apresentaram redução de filamentos e do número de células; além de reduzir a quantidade de UFCs presentes nos meios proporcionalmente à inibição metabólica dos biofilmes.

## REFERÊNCIAS

- AGNELLI, C. *et al.* Prognostic Trends and Current Challenges in Candidemia: A Comparative Analysis of Two Multicenter Cohorts within the Past Decade. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2023.
- AL JALALI, V. *et al.* In vitro activity of voriconazole and amphotericin B against *Candida albicans*, *Candida krusei*, and *Cryptococcus neoformans* in human cerebrospinal fluid. **Infection**, v. 47, n. 4, p. 565–570, 1 ago. 2019.
- ALLY, R. *et al.* Multicenter Trial of Voriconazole and Fluconazole in the Treatment of Esophageal Candidiasis in Immunocompromised Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1447–1454, 2001.
- ALVES, E. *et al.* An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. **Future Med. Chem.**, v. 6, n. 2, p. 141-164, 2014.
- AMORIM, L. M. M. *et al.* The Organochalcogen Compound (MeOPhSe)<sub>2</sub> Inhibits Both Formation and the Viability of the Biofilm Produced by *Candida albicans*, at Different Stages of Development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 33, p. 3964–3971, 2018.
- ARAÚJO, B. V. **Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; REX, J. H. Resistance to antifungal agents. In: **Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century**. [s.l: s.n.]. p. 325–326, 2008.
- BARROS, P. P. *et al.* *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. **Mycopathologia**, v. 185, n. 3, p. 415–424, 2020.
- BARROS, P. P. *et al.* *Candida krusei* and *Candida glabrata* reduce the filamentation of *Candida albicans* by downregulating expression of HWP1 gene. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 4, p. 317–323, 2017.
- BALTAZAR, L. M. *et al.* Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 7, p. 4003–4011, 2015.
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 2017.
- CALZAVARA-PINTON, P. *et al.* Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 88, n. 3, p. 512-522, 2012.
- CARMELLO, J. C. *et al.* Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species using Phorodithazine®. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 17, p. 194–199, 2017.

CAROLUS, H.; VAN DYCK, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. September, 2019.

CARVALHO, G. G.; FELIPE M. P.; COSTA M. S. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. **J. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 619, 2009.

CHANDRA, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 2001.

COLOMBO, A. L.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N. D.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 528–538, 2017.

CORNELY, O. A. *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Non-neutropenic adult patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. SUPPL.7, p. 19–37, 2012.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 1–24, 2017.

DAI, T. *et al.* Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5710–5717, 2011.

DANCINI, P. C; SANTOS, F. X.; FUKUCHI, I. Candidíase. **Revista Brasileira de Sexualidade Humana**, v. 12, n. 1, p. 22–38, 2020.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 245–254, 2004.

DENG, L. *et al.* Voriconazole inhibits cross-kingdom interactions between *Candida albicans* and *Actinomyces viscosus* through the ergosterol pathway. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 6, p. 805–813, 2019.

DENIS, J. *et al.* Isavuconazole: A new broad-spectrum azole. Part 1: In vitro activity. **Journal de Mycologie Medicale** Elsevier Masson SAS, 1 mar. 2018.

DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.

DONNELLY, J. P.; PAUW, B. E. Voriconazole - A new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 107–117, 2004.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1–12, 2008.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30–36, 2003.

DOUGLAS, L. J. Penetration of antifungal agents through *Candida* biofilms. **Methods in Molecular Biology**, v. 499, n. 9, p. 37–44, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2006–2012, 2014.

FLEISCHMANN, J.; SRIPUNTANAGOON, E. M. Pellicle associated adherence film above incubation broth surface - An inexpensive adjunct to recognizing *Candida krusei* in the laboratory. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 2–4, 2011.

GARLAND, M. J., *et al.* Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. **Future Med Chem.**, v. 1, n. 4, p. 667–691, 2009.

GIROLDO, L. M. *et al.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 1, p. 109–112, 2009.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1673–1689, 2020.

GÜZEL, A. B. *et al.* Clinical characteristics of Turkish women with *Candida krusei* vaginitis and antifungal susceptibility of the *C. krusei* isolates. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, 2013.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.

HARRIOTT, M. M. *et al.* *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, n. 12, p. 3635–3644, 2010.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3914–3922, 2009.

HARRIOTT, M. M.; NOVERR, M. C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 557–563, 2011.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L.; PHOENIX, D. Phenothiazinium Based Photosensitisers - Photodynamic Agents with a Multiplicity of Cellular Targets and Clinical Applications. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 615–627, 2005.

HERNANDEZ-CUELLAR, E. *et al.* Characterization of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilm on different surfaces. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 39, n. 2, p. 36–43, 2022.

HOSIDA, T. Y. *et al.* Interaction between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. **Mycoses Diagnosis, therapy and prophylaxis of fungal diseases**, v. 61, n. 4, p. 270–278, 2017.

HUANG, L. *et al.* Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 9, p. 3834–3841, 2010.

JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 14–30, 2021.

JOHNSON, L.; KAUFFMAN, C. Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. **Reviews Of Anti-Infective Agents**, v. 28, n. 4, p. 268–275, 2003.

KARYGIANNI, L. *et al.* Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668–681, 2020.

KEAN, R. *et al.* Gaining insights from *Candida* biofilm heterogeneity: One size does not fit all. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, 2018.

KLINGSPOR, L. *et al.* Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: A prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 87.e1–87.e10, 2015.

KONEČNÁ, K. *et al.* The Impact of Cultivation Media on the In Vitro Biofilm Biomass Production of *Candida spp.* **Current Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 2104–2111, 2021.

KUMAR, C. P. G.; MENON, T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 99–101, 2006.

KUMAR, S. *et al.* Characterisation and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species Isolated From Clinical Samples of Patients Attending Katihar Medical College, Katihar, Bihar. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 7, n. 05, p. 662–666, 2018.

LI, Yijun *et al.* O peróxido de hidrogênio potencializa a terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação do biofilme de duas espécies de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* da base da prótese. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 37, p. 102691, 2022.

LIU, H. *et al.* Characterization of the mechanism and impact of staphylokinase on the formation of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 355–367, 2019.

LOHSE, M. B. *et al.* Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018.

MADHAVAN, P. *et al.* In vitro activity of fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *Candida spp.* by E-test method. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 2, p. 200–207, 2010.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: Useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 2, p. 83–91, 2007.

MALANI, A. N.; KERR, L. E.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: How to Use This Antifungal Agent and What to Expect. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 786–795, 2015.

MANAVATHU, E. K.; CUTRIGHT, J. L.; CHANDRASEKAR, P. H. Organism-dependent fungicidal activities of azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p. 3018–3021, 1998.

MARAK, M. B.; DHANASHREE, B. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida spp.* Isolated from clinical samples. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 6–11, 2018.

MARTINS, N. *et al.* Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. **Mycopathologia**, v. 177, n. 5–6, p. 223–240, 2014.

MAZA, P. K. *et al.* *Candida albicans*: The ability to invade epithelial cells and survive under oxidative stress is unlinked to hyphal length. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, 17 jul. 2017.

MCDONALD I. J.; DOUGHERTY T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, p. 105–129, 2001.

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **J. Basic Applied Pharmac. Sci.**, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

MONTEIRO, D. R. *et al.* Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Biofouling**, v. 27, n. 7, p. 711–719, 2011.

MORAES, S. S. DE; FELIX, L. S.; BADIN, R. C. Antifúngicos azólicos: utilidade clínica e interações medicamentosas. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 66152–66169, 2022.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 301–309, 2004.

MUNIN, E. *et al.* Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 88, n. 1, p. 16–20, 2007.

NASUTION, A. I. Virulence Factor and Pathogenicity of *Candida albicans* in Oral Candidiasis. **World Journal of Dentistry**, v. 4, n. 4, p. 267–271, 2013.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Physiology & behavior**, v. 69, n. 3, p. 71–92, 2015.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923–1929, 1994.

ODDS, F.; KERRIAGE, D. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 12, n. 1, 1985.

ODDS, F. C. Candida infections - an overview. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–5, 1987.

OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em fotônicas. **Rev. Virt. Quím.**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.

OLIVEIRA, L. A.; CORTEZ, A. C. A.; SOUZA, J. V. B. DE. Identificação de espécies do gênero *Candida* mantidas na coleção de microrganismos de interesse médico do INPA. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, n. 10, p. 295–300, 2014.

OMMEN, P.; ZOBEB, N.; MEYER, R. L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 87–89, 2017.

OROZCO, A. S. *et al.* Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645–2649, 1998.

PALMA, A. L. *et al.* Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis* and their susceptibility to antimicrobial effects of photodynamic inactivation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 95–101, 2018.

PAPPAS, JP. G. *et al.* 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 2009.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1–20, 2018.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015.

PARAHITIYAWA, N. B. *et al.* Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. **Apmis**, v. 114, n. 4, p. 298–306, 2006.

PASSOS, J. C. S. *et al.* The inhibitory effect of photodynamic therapy on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Candida krusei* can be determined by *Candida albicans/Candida krusei* ratio. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 44, n. August, p. 103787, 2023.

PATHAK, A. K.; SHARMA, S.; SHRIVASTVA, P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 1, p. 70–75, 2012.

PEREIRA, C. A. *et al.* Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: An in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 3, p. 341–348, 2011.

PEREIRA-CENCI, T. *et al.* The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 8, p. 755–764, ago. 2008.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

PFALLER, M. A. *et al.* Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida spp.* revisited: Review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 3, p. 330–343, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PIERCE, C. G. *et al.* The *Candida albicans* biofilm matrix: Composition, structure and function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.

PINTO, A. P. *et al.* Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue O inhibits the viability of biofilm produced by *Candida albicans* at different stages of development. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 182–189, 1 mar. 2018.

PONDE, N. O. *et al.* *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91–111, 2021.

PORFÍRIO, B. E. C. *et al.* Cell surface hydrophobicity and biofilm formation of *Candida* yeast species in different culture media. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 3, p. 739–746, 2017.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208–217, 2015.

PRATES, R. A. *et al.* Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1525–1532, 2011.

PULCRANO, G. *et al.* Ambroxol influences voriconazole resistance of *Candida parapsilosis* biofilm. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 4, p. 430–438, 2012.

QUISHIDA, C. C. C. *et al.* Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 685–694, 2015.

RAMAGE, G. *et al.* Our Current Understanding of Fungal Biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340–355, 2009.

RAMOS, L. S. *et al.* Biofilm formed by *Candida haemulonii* species complex: Structural analysis and extracellular matrix composition. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 2020.

RODRIGUES, A. B. F.; PASSOS, J. C. S.; COSTA, M. S. Effect of antimicrobial photodynamic therapy using toluidine blue on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, n. April, p. 103600, 2023.

ROSA, C. F. **Candidemia em hospitais de alta complexidade no Brasil**: revisão narrativa da literatura. 2021. Monografia (Bacharel em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

ROSSETI, I. B. *et al.* *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)<sub>2</sub>, (MeOPhSe)<sub>2</sub>, (p-Cl-PhSe)<sub>2</sub>, (F 3CPhSe)<sub>2</sub>] and diphenyl ditelluride. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. 506–513, 2011.

ROSSETI, I. B.; CHAGAS, L. R.; COSTA, M. S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 1059–1064, 2014.

ROSSETI, I. B.; COSTA, M. S. The viability of biofilm produced by *Candida albicans* is decreased by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with toluidine blue. **Trends in Photochemistry & Photobiology**, v. 6, p. 19-24, 2014.

ROSSETI, I. B.; ROCHA, J. B. T.; COSTA, M. S. Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 289–295, 1 jan. 2015.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Veterinary World**, v. 14, p. 1608–1614, 2021.

SADANANDAN, B. *et al.* High throughput comparative assessment of biofilm formation of *Candida glabrata* on polystyrene material. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 39, n. 5, p. 1277–1286, 2022.

SALVATORE, M. M. *et al.* A model for microbial interactions and metabolomic alterations in *Candida glabrata* and *Staphylococcus epidermidis* dual-species biofilms. **PLoS ONE**, v. 17, n. 12 December, p. 1–27, 2022.

SAMARANAYAKE, Y. H. *et al.* The relative pathogenicity of *Candida krusei* and *C. albicans* in the rat oral mucosa. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 1047–1057, 1998.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: Biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 295–310, 1994.

SANATI, H. *et al.* A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2492–2496, 1997.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015.

SANTOS, J. D. *et al.* Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2016.

SANTOS, D. D. L. *et al.* Effect of curcumin-encapsulated Pluronic® F-127 over duo-species biofilm of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, p. 1-12, 2021.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–23, 2017.

SENEVIRATNE, C. J. *et al.* Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 11, p. 1052–1060, 2009.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: A mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582–590, 2008.

SERRANO-FUJARTE, I. *et al.* Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213–267, 2011.

SHARMA, J. *et al.* Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in *Candida* pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 1–28, 2019.

SHIN, J. H. *et al.* Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1244–1248, 2002.

SILVA, B. G. M. *et al.* Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using toluidine blue inhibits both growth and biofilm formation by *Candida krusei*. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 5, p. 983–990, 2018.

SILVA, S. M. *et al.* **Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes: Fungos**. v. 02. São José dos Pinhais: Latin American, 2021a.

SILVA, B. M. *et al.* (PhSe)<sub>2</sub> and (pCl-PhSe)<sub>2</sub> organochalcogen compounds inhibit *Candida albicans* adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities. **Biofouling**, v. 37, n. 2, p. 235–245, 2021b.

SILVA, B. G. M. *et al.* Diphenyl diselenide suppresses key virulence factors of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. **Biofouling**, v. 38, n. 5, p. 427–440, 2022.

SIQUEIRA, V. M. *et al.* (MeOPhSe)<sub>2</sub>, a synthetic organic selenium compound, inhibits virulence factors of *Candida krusei*: Adherence to cervical epithelial cells and biofilm formation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 73, n. May 2021, p. 0–8, 2022.

SINGH, R. *et al.* Relevance of antifungal penetration in biofilm-associated resistance of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 922–926, 2018.

SONNEBORN, A.; BOCKMÜHL, D. P.; ERNST, J. F. Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5514–5517, 1999.

SOUZA, S. C. *et al.* Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, n. 1, p. 34–38, 2006.

TAN, C. H. *et al.* All together now: experimental multispecies biofilm model systems. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 42–53, 2017.

TAN, Y. *et al.* Antibiofilm activity of carboxymethyl chitosan on the biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 77–82, 2016.

TAN, Y. *et al.* Efficacy of carboxymethyl chitosan against *Candida tropicalis* and *Staphylococcus epidermidis* monomicrobial and polymicrobial biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 150–156, 2018.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 8, p. 761–767, 2007.

TRIGO-GUTIERREZ, J. K. *et al.* Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 212–219, 2018.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

VERA, D. M. A. *et al.* Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 499–511, 2012.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235–239, 2017.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 42, p. 13–28, 1998.

WALL, G. *et al.* *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1–6, 2019.

WEERASEKERA, M. M. *et al.* Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 11, p. 697–702, 2016.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 529–553, 2007.

WIENCH, R. *et al.* Efficacy of toluidine blue—mediated antimicrobial photodynamic therapy on candida spp. A systematic review. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2021a.

WIENCH, R. *et al.* Influence of incubation time on ortho-toluidine blue mediated antimicrobial photodynamic therapy directed against selected *Candida* strains—An in vitro study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, 2021b.

WOLCOTT, R. *et al.* The polymicrobial nature of biofilm infection. **Clinical Microbiology and Infection**, Blackwell Publishing Ltd, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization**, 2022.

WU, P. F. *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patients. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 10, p. e87-7, 2017.

YANG, Z. *et al.* Correlation Between Drug Resistance and Virulence of *Candida* Isolates from Patients with Candidiasis. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, n. December, p. 7459–7473, 2022.

ZARNOWSKI, R. *et al.* *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS Biology**, v. 16, n. 10, p. 1–18, 2018.