

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA & DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

Ana Beatriz Furtado Rodrigues

**Efeito da terapia fotodinâmica com azul de toluidina sobre biofilme multiespécie  
de *C. albicans* e *C. krusei***

**Photodynamic therapy with toluidine blue-O effect on multispecies biofilm of *C.*  
*albicans* and *C. krusei***

São José dos Campos, SP.  
2023

Ana Beatriz Furtado Rodrigues

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE TOLUIDINA SOBRE  
BIOFILME MULTIESPÉCIE DE *C. albicans* E *C. krusei*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica como complementação de créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Maricilia Silva Costa.

São José dos Campos, SP.  
2023

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

RODRIGUES, ANA BEATRIZ FURTADO  
EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE TOLUIDINA SOBRE  
BIOFILME MULTIESPÉCIE DE C. ALBICANS E C. KRUSEI / ANA BEATRIZ  
FURTADO RODRIGUES; orientadora, MARICILIA SILVA COSTA. - São  
José dos Campos, SP, 2023.  
51 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. BIOFILME MULTIESPÉCIE. 3. TERAPIA  
FOTODINÂMICA. 4. CANDIDA ALBICANS. 5. CANDIDA KRUSEI. I. COSTA,  
MARICILIA SILVA, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, ANA BEATRIZ FURTADO RODRIGUES, 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, 4 de Abril de 2023.

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 08 / 03 / 2023

---

**ANA BEATRIZ FURTADO RODRIGUES**

**“EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE TOLUIDINA SOBRE BIOFILME  
MULTIESPÉCIE DE *C. albicans* e *C. krusei*.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, 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:

Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares	<i>Luís Eduardo Silva Soares</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Maricília Silva Costa	<i>Maricília Silva Costa</i>
Prof. Dr. Carlos Alberto Silva	<i>Carlos Alberto Silva</i>

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

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 08 de março de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus. Se cheguei até aqui, certamente não foi sozinha ou por acaso.

Agradeço imensamente aos meus pais. Por todo apoio, conselhos e, muitas vezes, paciência, para lidar com minhas frustrações.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório. Sem vocês tenho total convicção de que não conseguiria me divertir tanto enquanto passava horas e horas fazendo experimentos que nem sempre eram bem-sucedidos. Obrigada pela companhia, paciência e distração.

À professora Maricília Silva Costa pela orientação e colaboração neste período. Assim como aos membros da banca pelas críticas e sugestões.

À UNIVAP, IP&D e PPGEB, mas também aos professores, equipe de coordenação e secretaria, biblioteca, e tantos outros funcionários e funcionárias que estiveram presentes em minha jornada, mesmo que indiretamente, prestando seu auxílio.

Por fim, mas não menos importante, obrigada à CAPES. Se há uma razão pela qual fui capaz de realizar este curso, foi graças ao apoio financeiro da bolsa que pude usufruir por dois anos.

## RESUMO

Biofilmes são agrupamentos de microrganismos que garantem vantagens e alto nível de organização, elevado índice de sobrevivência a condições adversas, além de proteção contra a ação de antimicrobianos e evasão do sistema imunológico. Podem ser formados por uma ou mais espécies, sendo que aqueles constituídos por diferentes espécies são mais resistentes a ação das drogas. Até o presente momento estão disponíveis para terapia convencional um pequeno número de antifúngicos, divididos em três classes: polienos, azóis e equinocandinas. São tratamentos que podem apresentar efeitos colaterais como nefrotoxicidade. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que se baseia na interação da luz com o fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular, acarretando numa reação fotoquímica que gera espécies citotóxicas que promovem morte celular. Há algum tempo vem sendo empregada no tratamento de infecções cutâneas, pois apresenta poucos efeitos adversos para o paciente. Tendo em vista o desafio de tratar infecções causadas por microrganismos resistentes e que estejam acompanhadas de biofilmes, torna-se necessária a busca por tratamentos para infecções com múltiplas espécies, sobretudo que tragam menos riscos. Com isso, o presente estudo visa analisar os efeitos da TFD com azul de toluidina (AT) sobre biofilme multiespécie formado de *C. albicans* e *C. krusei*. Para realização dos experimentos as culturas foram cultivadas em ágar Sabouraud e incubadas em estufa bacteriológica por 48h, a 37°C. Após este período, uma amostra de cada espécie foi recolhida e suspensa em solução fisiológica estéril. Como fonte de luz visível foi empregado um diodo emissor de luz (LED) com potência de 0,068 W, iluminando uma área de 0,38 cm<sup>2</sup>, comprimento de onda de 630nm e densidade de energia de 30 J.cm<sup>-2</sup>, e tempo de irradiação de 2 minutos e 45 segundos. A atividade metabólica do biofilme foi determinada por reação de redução do sal XTT, além de observação ao microscópio. Pode-se concluir que, com base nos dados obtidos no presente estudo, a TFD com AT apresentou efeito sobre o biofilme multiespécie formado, promovendo redução de sua atividade metabólica.

Palavras-chave: biofilme multiespécie; *Candida albicans*; *Candida krusei*; terapia fotodinâmica.

## ABSTRACT

Biofilms are microorganisms' groupings that ensure advantages and high levels of organization, increased rates of survival against critical conditions, as well as protection against the performance of antimicrobials and evasion of the immunologic system. They can be formed of one or more species, and those constituted by different species are more resistant to drugs performances. Until the present moment, a small number of antifungals are available for conventional therapy divided into three classes: polyenes, azoles and echinocandins. These treatments may cause side effects such as nephrotoxicity. Photodynamic therapy (PDT) is a technique based on the interaction of light with a photosensitizer (PS) and molecular oxygen, promoting a photochemical reaction that creates cytotoxic species which cause cell death. It's been employed for some time on the treatment of cutaneous infections because it has few adverse effects for the patient. Considering the challenge of treating infections caused by resistant microorganisms and that are accompanied by biofilms, it becomes necessary the search for treatments for infections with multiple species, especially those that bring less risks. With that, the present study aims to analyze the effects of PDT with Toluidine Blue-O (TBO) on a formed multispecies biofilm of *C. albicans* and *C. krusei*. To carry out the experiments the cultures were cultivated on Sabouraud agar and incubated in bacteriological greenhouse for 48h, at 37°C. After this period, a sample of each species was collected and suspended in sterile physiological solution. As a visible light source, a light emitting diode (LED) was used, with an output of 0,068 W, illuminating an area of 0,38 cm<sup>2</sup>, wavelength of 630 nm and energy density of 30 J·cm<sup>-2</sup>, and 2 minutes and 45 seconds of irradiating time. The biofilm's metabolic activity was determined by the reduction of the XTT salt, in addition to light microscopy observation. It can be concluded that, based on the obtained data, PDT with TBO exhibited effect on the formed multispecies biofilm, fomenting reduction of its metabolic activity.

Key words: multispecies biofilm; *Candida albicans*; *Candida krusei*; photodynamic therapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Caracterização de biofilme multiespécie formado. ....	29
Figura 2 – UFCs/ml em meio Chromágar para caracterização de biofilme multiespécie. ....	30
Figura 3 – UFCs/ml em meio Chromágar. ....	31
Figura 4 – Crescimento multiespécie após TFD. ....	32
Figura 5 – Porcentagem de atividade metabólica de formação de biofilme multiespécie após TFD. ....	33
Figura 6 – Formação de biofilme multiespécie após TFD. ....	34
Figura 7 – UFCs/ml em meio Chromágar de formação de biofilme multiespécie após TFD. ....	35
Figura 8 – Contagem de UFCs/ml em meio Chromágar de formação de biofilme multiespécie após TFD. ....	36
Figura 9 – Porcentagem de atividade metabólica de biofilme multiespécie formado após TFD. ....	37
Figura 10 – Observação ao microscópio do biofilme multiespécie formado após TFD. ....	38
Figura 11 – UFCs/ml em meio Chromágar de biofilme multiespécie formado após TFD. ....	39
Figura 12 – Contagem de UFCs/ml em meio Chromágar de biofilme multiespécie formado após TFD. ....	40

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1	BIOFILMES.....	10
1.1.1	<i>Candida albicans</i> .....	11
1.1.2	<i>Candida krusei</i> .....	12
1.2	TERAPIAS CONVENCIONAIS .....	14
1.3	TERAPIA FOTODINÂMICA .....	16
1.3.2	Terapia fotodinâmica antimicrobiana .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME MULTIESPÉCIE.....	21
3.2	CRESCIMENTO MULTIESPÉCIE .....	22
3.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	24
3.4	BIOFILME FORMADO.....	26
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME MULTIESPÉCIE.....	29
4.2	CRESCIMENTO MULTIESPÉCIE APÓS TFD .....	31
4.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME MULTIESPÉCIE APÓS TFD .....	32
4.4	BIOFILME MULTIESPÉCIE FORMADO APÓS TFD.....	36
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIOFILMES

Biofilmes são agrupamentos de microrganismos considerados um importante fator de virulência, que garante vantagens e alto nível de organização para bactérias ou fungos livres durante a colonização do hospedeiro (QUISHIDA *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2021; SACHIVKINA; PODOPRIGORA; BOKOV, 2021). Este padrão de crescimento microbiológico vem sendo amplamente estudado ao redor do mundo devido às suas particularidades, como elevado índice de sobrevivência a condições adversas ao seu crescimento (como variações de pH), além de proteção contra a ação de antimicrobianos e evasão do sistema imunológico (HACIOGLU *et al.*, 2019; MISHRA *et al.*, 2020; PONDE *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2016; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007).

Os biofilmes formados por mais de uma espécie geralmente são mais resistentes a ação de antimicrobianos se comparados às células livres ou a biofilmes formados de uma única espécie (CARMELLO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007; TRIGO-GUTIERREZ *et al.*, 2018). Isto pode ser explicado pelo fato de que este grupo de microrganismos além de ser protegido por uma matriz extracelular que atrapalha a difusão de antimicrobianos, é uma comunidade heterogênea que conta com células em elevada atividade metabólica e outras em estado de latência. Logo, para erradicar estes biofilmes, é necessário usar doses combinadas e em maiores concentrações das drogas antimicrobianas que, por sua vez, podem trazer graves consequências para o paciente, como comprometimento renal e/ou hepático (LOHSE *et al.*, 2018; PONDE *et al.*, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

São necessárias quatro etapas para a formação do biofilme: 1<sup>a</sup>- adsorção e adesão, fase correspondente ao encontro de um substrato, abiótico ou biótico, e que pode ser revertida; 2<sup>a</sup>- formação de micro colônias, consiste na concepção da matriz extracelular e proliferação de células planctônicas; 3<sup>a</sup>- maturação; 4<sup>a</sup>- desprendimento e dispersão, que significa que algumas células sessais se soltam do biofilme para disseminar a infecção. Apesar de a formação do biofilme ser composta por estas quatro fases, pode haver características específicas referentes a cada

estágio de acordo com a espécie do microrganismo (BARROS *et al.*, 2016; PONDE *et al.*, 2021; QUISHIDA *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

Atiencía-Carrera *et al.* (2022) em sua meta-análise destacou o papel do gênero *Candida* spp. nas infecções sistêmicas. Este tipo de infecção ocorre mundialmente, podendo acometer a maioria dos pacientes hospitalizados e, apesar da ausência de padronização de metodologia, notou-se que a taxa de morbidade e mortalidade eram elevadas. Além disso, muitos autores falharam na correlação da infecção com a presença de biofilmes, o que, por si só, já prejudica o tratamento (ATIENCIA-CARRERA *et al.*, 2022).

El-Azizi e colaboradores (2004) propuseram com seu trabalho mais esclarecimentos a respeito das interações polimicrobianas utilizando cepas de *C. albicans* e *C. krusei* junto às cepas de diferentes bactérias, como *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens*. Foi constatado que diferentes interações resultam em diferentes biofilmes, ou seja, dependendo do microrganismo que esteja ocupando um mesmo sítio, pode haver uma população microbiana maior ou menor, o que, por sua vez, leva a biofilmes com mais ou menos adesão às superfícies (EL-AZIZI; STARKS; KHARDORI, 2004)

Como já descrito na literatura, raramente biofilmes na natureza ou *in vivo* são compostos de apenas um microrganismo. Logo, os tratamentos e a própria via de ação dos antimicrobianos são afetados em infecções em que eles estejam presentes. Assim como, as interações entre as espécies podem trazer benefícios que facilitem sua sobrevivência (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; EL-AZIZI; STARKS; KHARDORI, 2004; LOHSE *et al.*, 2018).

### **1.1.1 *Candida albicans***

*Candida albicans* é uma espécie de fungo comumente observada na forma de levedura, mas que também pode apresentar hifas e pseudohifas (DE BARROS *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2018). É um microrganismo comensal, sendo encontrado na microbiota normal da pele, mucosa oral, trato genital e gastrointestinal de indivíduos saudáveis, mas que pode passar a se comportar como oportunista quando

alterações ambientais possibilitam sua super proliferação e, conseqüentemente, causar infecções chamadas de candidíases (CAROLUS; VAN DYCK; VAN DIJCK, 2019; LOHSE *et al.*, 2018; TRIGO-GUTIERREZ *et al.*, 2018).

Dentre outras características deste fungo, pode-se citar a capacidade de formar biofilmes. O que representa um perigo em ambiente hospitalar, principalmente em pacientes com internação duradoura ou uso de antibióticos por tempo prolongado (Carolus *et al.*, 2019; Mishra *et al.*, 2020).

Os biofilmes de *Candida albicans* são complexos e bem estruturados, sendo regidos por fatores genéticos e constituídos por hifas e pseudohifas, além duma matriz extracelular capaz de bloquear a difusão dos antifúngicos comumente empregados nas candidíases. Além disso, interações entre biofilmes multiespécie formados por *C. albicans* e algumas espécies de bactérias, como *Staphylococcus aureus*, possibilitam maiores benefícios e sobrevivência aos microrganismos, como variedade na troca de nutrientes e interação química (HACIOGLU *et al.*, 2019; LOHSE *et al.*, 2018; PONDE *et al.*, 2021; SALEHI *et al.*, 2020).

Rosseti, Rocha e Costa (2015) propuseram em seu trabalho a utilização de compostos organocalcogêneos na inibição da formação de biofilme de *C. albicans*, além de determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da permeabilidade da membrana. O uso do composto não apenas levou a inibição do biofilme produzido pela levedura, como também fez com que a permeabilidade da membrana fosse prejudicada. Quando isto ocorre, a célula não consegue mais manter controle sobre a entrada e saída de moléculas, por exemplo, levando a instabilidade e, futuramente, morte celular (ROSSETI; ROCHA; COSTA, 2015)

### **1.1.2 *Candida krusei***

*Candida krusei* é uma espécie de fungo também leveduriforme, parte da microbiota normal humana na região genital de indivíduos saudáveis e caracterizada como sendo um microrganismo oportunista (DA SILVA *et al.*, 2018; GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007). Isto se dá pelo fato de que,

em pacientes imunocomprometidos, por exemplo, este fungo deixa de atuar como microrganismo comensal e passa a colonizar outros sítios no organismo deste indivíduo, podendo provocar desde infecções superficiais até candidíases graves e sistêmicas (DA SILVA *et al.*, 2018; GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994).

Esta levedura é comumente visualizada ao microscópio em formato cilíndrico, sendo a única espécie do gênero a apresentar-se desta forma, pois as demais são encontradas em formato esférico. *Candida krusei* apresenta resistência intrínseca a uma das principais drogas antimicrobianas empregadas no tratamento de infecções fúngicas, o fluconazol, além de apresentar, conforme estudos já vem evidenciando, susceptibilidade reduzida a outros antifúngicos disponíveis para os tratamentos convencionais das famílias dos azóis e dos polienos (DA SILVA *et al.*, 2018; DOVIGO *et al.*, 2010; FARIA *et al.*, 2020; GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020).

Este fato torna-se um grande desafio para a comunidade médica e científica, pois este fungo além de estar associado a infecções graves e com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, torna cada vez mais necessária a busca por novas terapias que sejam capazes de tratar tais micoses (DA SILVA *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2020; GÓMEZ-GAVIRIA & MORA-MONTES, 2020; THEIN *et al.*, 2007).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais isolada de infecções ocasionadas por este gênero, nos últimos anos têm-se observado que *C. krusei* vem ganhando espaço, especialmente em ambiente hospitalar, onde caracteriza-se por sua maior taxa de mortalidade e baixa resposta às terapias antifúngicas utilizadas (DA SILVA *et al.*, 2018; DE BARROS *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2020; GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994; THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007).

Ademais, é sabido que esta espécie também é capaz de formar biofilme, tanto em superfícies bióticas como abióticas. Isto colabora para sua disseminação em dispositivos médicos, por exemplo, e a partir disto surgem implicações graves, como infecções sistêmicas (DA SILVA *et al.*, 2018; DE BARROS *et al.*, 2017; FARIA *et al.*, 2020; GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020).

## 1.2 TERAPIAS CONVENCIONAIS

À medida que foi-se ganhando conhecimento sobre os fungos, surgiu ao mesmo tempo a busca e a necessidade de tratamentos para as infecções por eles causadas. Até o presente momento estão disponíveis para terapia convencional um pequeno número de antifúngicos, divididos em três classes: polienos, azóis e equinocandinas (NETT; ANDES, 2016; RICARDO *et al.*, 2020; SALAZAR *et al.*, 2020; SCORZONI *et al.*, 2013, 2017, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

Os polienos tem como principal integrante a anfotericina B e atuam principalmente na inibição de biossíntese de ergosterol, um componente que garante fluidez à membrana. Isto ocasiona a formação de poros, prejudicando a função e permeabilidade da membrana, e, conseqüentemente, levando à morte celular (NETT; ANDES, 2016; RICARDO *et al.*, 2020; SALAZAR *et al.*, 2020; SCORZONI *et al.*, 2013, 2017, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

Foi no final da década de 1950 que um dos principais avanços terapêuticos no tratamento de infecções fúngicas tomou lugar, o desenvolvimento da anfotericina B. Até os dias atuais é considerada uma droga potente e está restrita ao uso hospitalar, pois apresenta um importante efeito adverso: nefrotoxicidade. Logo, seu uso deve ser por períodos curtos, e para tratar apenas alguns tipos de infecções, como as sistêmicas e profundas (NETT; ANDES, 2016; SALAZAR *et al.*, 2020; SCORZONI *et al.*, 2017, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

Poucos anos após o desenvolvimento da anfotericina B, surgiram os primeiros antifúngicos do grupo dos azóis: cetoconazol e miconazol. Até hoje esta classe representa os principais antifúngicos empregados nos tratamentos de vários tipos de infecções superficiais. Os azóis apresentam função fungicida semelhante aos polienos (NETT; ANDES, 2016; RICARDO *et al.*, 2020; SALAZAR *et al.*, 2020; SCORZONI *et al.*, 2013, 2017, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

Por fim, as equinocandinas são a classe mais recente, introduzidas ainda no início dos anos 2000 e tendo como principal droga a caspofungina. Esta classe atua na inibição da biossíntese de outro composto essencial aos fungos, um glucano

presente na matriz extracelular e constituinte da parede celular (NETT; ANDES, 2016; SALAZAR *et al.*, 2020; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

Ricardo e colaboradores (2020) observaram em seu estudo que as espécies de *C. krusei* obtidas de pacientes com infecções no trato urinário apresentaram resistência, ou ao menos suscetibilidade reduzida, ao Voriconazol. Foi ressaltado ainda que a demora no início do tratamento, demora para identificar o microrganismo causador da infecção e uso de doses menores que o necessário podem ser alguns dos responsáveis pela resposta ruim de diversas terapias antifúngicas (RICARDO *et al.*, 2020).

No trabalho realizado por Scorzoni et al (2013) notou-se que a partir da inoculação de cepas de *C. albicans* e *C. krusei* em larvas observou-se que *C. krusei* apresentou resistência ao fluconazol, além de suscetibilidade reduzida a anfotericina B, voriconazol e caspofungina, levando, inclusive, à morte de alguns espécimes. Este resultado corrobora com outros já descritos na literatura a respeito da resistência encontrada em amostras de *C. krusei* (NETT; ANDES, 2016; RICARDO *et al.*, 2020; SALAZAR *et al.*, 2020; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020). Em contrapartida, larvas infectadas por *C. albicans* tiveram taxa de sobrevivência superior apesar de terem sido tratadas com os mesmos antifúngicos.

Prazynska e Gospodarek (2014) observaram em seu estudo, que fez uso da anfotericina B em diversos estágios da formação de biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, que em biofilmes mais maduros, isto é, a partir de 24h de formação, o efeito desta droga é diminuído para as três espécies. Ademais, notou-se que, comparado às células planctônicas, a suscetibilidade à anfotericina B também foi menor. Estes dados, por sua vez, mostram que há uma dificuldade significativa em tratar infecções e até mesmo erradicar biofilmes fúngicos mesmo com os antimicrobianos mais potentes (PRAŻYŃSKA; GOSPODAREK, 2014).

Acredita-se que a resistência aos antimicrobianos usados no tratamento de infecções fúngicas com biofilme tenha diversas causas e isto já foi relatado em literatura. Dentre as principais causas pode-se citar: presença de um maior número de células; interações entre medicamentos; super regulação de genes que promovem a resistência aos antifúngicos; dificuldade de penetração da droga nas células devido à matriz celular, que ainda possibilita fuga do sistema imune; resposta

evolutiva dos próprios microrganismos (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; PRAŽYŇSKA; GOSPODAREK, 2014; RAO *et al.*, 2021; SALAZAR *et al.*, 2020; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020).

### 1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) pode ser compreendida como uma técnica que une a ação de uma luz visível com uma substância denominada fotossensibilizador (FS). Esta interação da luz com o FS leva a uma reação fotoquímica, cujo mecanismo de ação se dá se por meio da interação dele com a luz, em comprimento de onda específico, e com o oxigênio presente no meio (ASTUTY *et al.*, 2019; GÜZEL TUNCCAN *et al.*, 2018; LEITE; PIVA; MARTINS-FILHO, 2015; MAJEWSKI; JORGE; JUNQUEIRA, 2014; PERUSSI, 2007; WAINWRIGHT, 1998).

Uma vez feita a irradiação, o FS é ativado, acarretando na absorção de fótons de luz e levando seus elétrons a um estado de excitação e instabilidade. Quando isto ocorre, é necessário que o FS transfira a energia para outro lugar, ou seja, um substrato. Esta transferência de energia gera espécies reativas de oxigênio (oxigênio singleto), radicais livres e íons peróxidos. Estes produtos, por sua vez, levam à morte celular, pois são tóxicos para as células, sendo capazes de destruir a parede celular, organelas e até mesmo promover danos ao DNA celular por oxidação e o substrato pode ser células de um tecido alvo ou um microrganismo. A geração destes compostos citotóxicos só acontece devido à associação entre a luz, o FS e o oxigênio, pois se usados separadamente não há reação (GÜZEL TUNCCAN *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2015; MAJEWSKI *et al.*, 2014; RODRIGUES PERUSSI, 2007; RODRÍGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2021; WAINWRIGHT, 1998).

Dentre suas vantagens, pode-se citar o fato de que não há uso de radiação ionizante e há riscos baixos de efeitos colaterais devido ao fato de a aplicação ser localizada e não haver acúmulo de efeitos tóxicos. Ademais, seu uso é relativamente fácil e não há formação de espécies de microrganismos resistentes. Por estes motivos que há décadas a TFD vem sendo empregada como uma modalidade terapêutica no tratamento de diversas neoplasias e doenças infecciosas

ocasionadas por microrganismos, graças à sua capacidade de eliminar as células no local em que for aplicada (MAJEWSKI; JORGE; JUNQUEIRA, 2014; PERUSSI, 2007; WAINWRIGHT, 1998).

### 1.3.2 Terapia fotodinâmica antimicrobiana

Inicialmente direcionada para o tratamento de diversos tipos de câncer, a TFD ganhou espaço nas últimas décadas em especial quando notou-se a aplicabilidade desta terapia também no controle de infecções, tais como as cutâneas.

Cai et al (2019) ressaltaram em seu estudo que a TFD foi mais eficaz na descontaminação de uma superfície de titânio do que antissépticos convencionais, levando a uma redução significativa de UFCs de *S. aureus* (CAI *et al.*, 2019).

O trabalho de Da Silva Passos et al (2019) também destacou resultados similares, evidenciando a capacidade da TFD na redução do crescimento leveduriforme de *P. brasiliensis*, um importante fungo causador de graves infecções pulmonares. Foi relatado que a terapia aplicada com LED e Azul de Toluidina (AT) em diferentes concentrações foi capaz de reduzir o crescimento do micélio e, assim, inibir a transição para levedura após irradiação, impactando de forma significativa num dos principais fatores de virulência deste fungo. Ademais, notou-se que quanto maior a concentração do FS e da fluência aplicada, maior era a redução do crescimento, alcançando 32% na concentração de 0,001 mg/ml e 30 J/cm<sup>2</sup>. Logo, mais uma vez, corroborando com relatos já encontrados na literatura sobre a eficácia da TFD (DA SILVA PASSOS *et al.*, 2019)

Costa et al (2011) propuseram uso da TFD sobre células planctônicas e biofilme mono-espécie de *C. albicans* e *C. dubliniensis* utilizando um LED verde e eritrosina como FS. Reafirmando dados já relatados por outros autores, a terapia foi eficaz na redução do crescimento de ambas as espécies, promovendo queda de UFCs e de filamentos nos biofilmes (COSTA *et al.*, 2011).

O trabalho de Sousa et al (2016) sugeriu o uso da TFD sobre biofilmes de *C. albicans* com Azul de Metileno e Protoporfirina IX como FS. Destacando a dificuldade de erradicar biofilmes das mais variadas superfícies e que, ao final, a terapia não foi capaz de esterilizá-las, porém os dados revelaram que a TFD promoveu redução das UFCs em 2 ordens de magnitude (SOUSA *et al.*, 2016).

Carmello e colaboradores (2019) utilizaram TFD com nanoemulsão para tratar infecções orais causadas por *C. albicans* em ratos, além de investigar os efeitos da irradiação por LED na adesão e formação de biofilme. Por meio da contagem de UFCs, verificou-se que o estudo foi bem-sucedido, pois foi confirmada a diminuição na adesão das leveduras na superfície mucosa, mas também redução da formação de biofilme nos animais tratados (CARMELLO *et al.*, 2019).

O uso de um laser sobre biofilmes maduros de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* foi sugerido por Wiench e colaboradores (2019). Aplicando diferentes densidades de energia *in vitro*, a redução de UFCs foi estatisticamente significativa para as três espécies. Esta evidência mostra que, seja com laser ou LED, a TFD pode ser empregada na inibição de diversos microrganismos, inclusive as leveduras do gênero *Candida*. Entretanto, este trabalho foi limitado, pois não apresentou outras formas de verificar e afirmar o quanto a TFD prejudicou a estrutura do biofilme, por exemplo, dadas as informações que estão disponíveis na literatura e que reforçam o fato de que biofilmes apresentam células em estado de latência e apenas a determinação de UFCs não reproduz os resultados como um todo (WIENCH *et al.*, 2019).

No mundo atual já se é amplamente discutido o desafio cada vez mais crescente de tratar infecções causadas por microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais disponíveis no mercado. Ademais, tratando-se de biofilmes o desafio é ainda maior devido à necessidade do uso de doses maiores de antimicrobianos, gerando diversos efeitos colaterais para o paciente. Quando este biofilme é formado por mais de uma espécie é preciso ainda encontrar antimicrobianos que sejam capazes de tratar todas as espécies identificadas (LOHSE *et al.*, 2018; MISHRA *et al.*, 2020; PONDE *et al.*, 2021; QUISHIDA *et al.*, 2015; SHE *et al.*, 2020; VILA *et al.*, 2021).

Apesar da existência de inúmeros estudos com biofilmes e TFD, é escasso o número de trabalhos empregando esta técnica em biofilmes multiespécie envolvendo *C. albicans* e *C. krusei*. Visto isso, torna-se cada vez mais necessário a busca por novos tratamentos para infecções com múltiplas espécies, sobretudo os que tragam menos riscos ao paciente.

Com isso, o presente estudo visa analisar os efeitos da TFD com azul de toluidina (AT) sobre crescimento, formação de biofilme e biofilme multiespécie formado de *C. albicans* e *C. krusei*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da TFD com azul de toluidina (AT) sobre biofilme multiespécie formado de *C. albicans* e *C. krusei*.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar os efeitos da TFD com azul de toluidina (AT) na redução do crescimento e da formação de biofilme multiespécie de *C. albicans* e *C. krusei*, assim como na redução de atividade metabólica de biofilme multiespécie formado.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Bioquímica Aplicada à Engenharia Biomédica, no Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

Para realização dos experimentos as culturas de *Candida albicans* (ATCC 1023) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram cultivadas em ágar Sabouraud (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) e incubadas em estufa bacteriológica por 48h, a 37°C, em ar atmosférico. Após este período, uma amostra de cada espécie foi obtida a partir de colônias puras crescidas no ágar e suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%).

As amostras foram mantidas em placas de ágar Sabouraud e em estufa bacteriológica à 37°C (ar atmosférico), sendo repicadas duas vezes por semana para que todos os ensaios realizados fossem efetivados com colônias frescas e recém-crescidas.

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME MULTIESPÉCIE

A fim de melhor compreender as características do biofilme multiespécie de *C. albicans* e *C. krusei* foi realizada uma caracterização do mesmo com intuito de identificar se haveria prevalência de uma das espécies durante a formação de biofilme formado. Para isto, as duas espécies foram submetidas à formação do biofilme misto sem interferência de qualquer tratamento.

Assim sendo, primeiramente um inóculo foi preparado com auxílio de uma alça de platina a partir da coleta de colônias puras crescidas em ágar Sabouraud, e diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, a densidade celular final foi ajustada em câmara de Neubauer para  $10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>.

Feito isto, foi preparado um mix contendo proporções iguais de ambas as espécies (1:1). Deste mix, 25 µl foram adicionados a poços de uma placa de

microtitulação de 96 poços estéril contendo RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) para obter volume final de 200 µl. Esta placa foi colocada em estufa bacteriológica por 24h, a 37°C, em ar atmosférico.

Transcorrido este tempo, foi observada a formação de biofilme. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com 200 µl de PBS, duas vezes. O sobrenadante foi diluído até  $10^3$  e imediatamente uma alíquota de 10 µl foi plaqueada em Chromágar (Difco) a fim de permitir a identificação de cada espécie por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Depois de realizada a lavagem dos poços, à cada um foi adicionado 200 µl solução salina estéril para fazer a raspagem do biofilme no fundo do poço. Este processo consistiu em, com auxílio de uma ponteira estéril, raspar o conteúdo aderido ao fundo do poço e, assim, remover as células do biofilme.

O conteúdo da raspagem do biofilme foi diluído 2000 vezes e uma alíquota de 10 µl foi imediatamente semeada em Chromágar (placa de Petri 90x15 mm) para contagem de UFCs com alça de Drigalski. As placas de Chromágar foram mantidas em estufa bacteriológica por 48h, a 37°C, em ar atmosférico.

De modo a garantir que a suspensão mista tivesse proporções iguais de ambas as espécies, foi preparada uma diluição de 1000 vezes e a partir disto uma alíquota de 10 µl foi semeada em Chromágar e mantida em estufa por 48h, a 37°C, em ar atmosférico.

### 3.2 CRESCIMENTO MULTIESPÉCIE

Primeiramente, com auxílio de uma alça de platina, foi preparado um inóculo de *C. albicans* e *C. krusei* a partir de uma alçada de colônias puras do ágar Sabouraud e suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. A densidade celular final foi ajustada em câmara de Neubauer para  $10^5$  cél.ml<sup>-1</sup>. Do mesmo modo que feito com na caracterização do biofilme multiespécie, para a realização do crescimento multiespécie foi preparado uma suspensão mista de ambas as espécies formada de proporções iguais (1:1).

Para realização da TFD, então, foi preparado o meio de reação em uma placa de microtitulação de 96 poços estéril onde foi adicionado 180 µl de solução salina (NaCl 0,9%) estéril a um poço e em seguida acrescentado 20 µl do inóculo misto. Este grupo foi determinado como controle.

Ademais, em outra placa foi adicionado 160 µl de salina estéril, 20 µl da suspensão mista de *C. albicans* e *C. krusei* e 20 µl do FS, azul de toluidina (AT) para obter uma concentração final de 0,05 mg.ml<sup>-1</sup>. Em uma terceira placa então foi adicionado 140 µl de salina estéril, 20 µl da suspensão de *C. albicans* e *C. krusei* e 40 µl do FS para obter concentração final de 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>.

Após a preparação do meio de reação, as placas foram cobertas e mantidas no escuro por 10 minutos.

Transcorrido o tempo de incubação no escuro, cada placa foi retirada do escuro e uma alíquota de 20 µl foi transferida à uma placa de 24 poços contendo 1980 µl de caldo Sabouraud. Somente depois de feito isto é que se procedeu com a irradiação.

Como fonte de luz visível foi empregado um diodo emissor de luz (LED) com potência de 0,068 W, iluminando uma área de 0,38 cm<sup>2</sup>, comprimento de onda de 630nm e densidade de energia de 30 J.cm<sup>-2</sup>, e tempo de irradiação de 2 minutos e 45 segundos. O volume final irradiado foi de 160 µl.

Após a irradiação, uma nova alíquota de 20 µl foi retirada de cada poço irradiado e adicionada ao seu poço correspondente na placa de 24 poços contendo caldo Sabouraud. Este procedimento foi feito para todas as condições de estudo estabelecidas, conforme exemplificado abaixo.

A aplicação de luz e uso de FS foram identificados pelas letras 'L' e 'FS', respectivamente, sendo a presença distinguida pelo sinal positivo (+) e a ausência pelo sinal negativo (-).

- Grupo 1: controle, sem aplicação de luz ou de FS (L-FS-);
- Grupo 2: aplicação de luz, porém sem FS (L+FS-);
- Grupo 3: AT 0,05 mg.ml<sup>-1</sup>, sem aplicação de luz (L-FS+0,05);
- Grupo 4: AT 0,05 mg.ml<sup>-1</sup>, com aplicação de luz (L+FS+0,05);

- Grupo 5: AT 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, sem aplicação de luz (L-FS+0,1);
- Grupo 6: AT 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, com aplicação de luz (L+FS+0,1).

A placa contendo as alíquotas em caldo Sabouraud foram mantidas em estufa bacteriológica por 18h, a 37°C (ar atmosférico). Após este período, o conteúdo foi homogeneizado e foi feita leitura de absorvância em 570 nm (OD<sub>570</sub>) em um leitor de microplacas (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader; Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Os experimentos foram realizados em triplicata e sob condições assépticas.

### 3.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Além estudar o efeito da TFD sobre o crescimento misto de *C. albicans* e *C. krusei*, foi realizado também um estudo do efeito sobre a formação de biofilme multiespécie.

Para avaliar os efeitos da TFD com AT na formação de biofilme, foi preparado um inóculo de cada espécie em solução salina (NaCl 0,9%) estéril, conforme descrito anteriormente e o LED empregado nos mesmos parâmetros utilizados no crescimento multiespécie.

Para a realização deste estudo e melhor compreensão dos efeitos da TFD com AT na formação de biofilme multiespécie, foram definidos os seguintes grupos de estudo:

- Grupo 1: controle, sem aplicação de luz ou de FS (L-FS-);
- Grupo 2: aplicação de luz, porém sem FS (L+FS-);
- Grupo 3: AT 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>, sem aplicação de luz (L-FS+0,05);
- Grupo 4: AT 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>, com aplicação de luz (L+FS+0,05);
- Grupo 5: AT 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, sem aplicação de luz (L-FS+0,1);
- Grupo 6: AT 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, com aplicação de luz (L+FS+0,1).

A aplicação de luz e uso de FS foram identificados pelas letras 'L' e 'FS', respectivamente, sendo a presença distinguida pelo sinal positivo (+) e a ausência pelo sinal negativo (-).

Em uma placa de 96 poços estéril, foi adicionado 125 µl de salina estéril e 25 µl da suspensão mista. Esta placa foi coberta e mantida no escuro por 10 minutos em temperatura ambiente e este grupo foi determinado como controle.

Em outras duas placas de 96 poços foram adicionadas salina estéril, a suspensão mista e o FS nas concentrações de 0,05 e 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, num volume final de 150 µl. As placas também foram cobertas e mantidas no escuro por 10 minutos após adição do FS.

Transcorrido o tempo de incubação, as placas dos grupos com aplicação da luz foram retiradas do escuro e fez-se a irradiação.

Depois disso, para todos os grupos, aguardou-se 90 minutos para remoção do sobrenadante de forma cuidadosa. Em seguida, os poços foram lavados com 100 µl de PBS estéril, duas vezes. Por fim, foi adicionado 200 µl de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) aos poços e as placas foram levadas para estufa bacteriológica por 24h, a 37°C, em ar atmosférico.

Passado este tempo, foi feita avaliação de atividade metabólica do biofilme por meio da reação de redução do sal XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide sodium salt) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), além de observação ao microscópio. Antes de cada ensaio, a solução de XTT foi preparada e misturada com uma solução 0,04 mM de menadione recém preparada.

Para isto, o meio foi removido e cada poço lavado duas vezes com 100 µl de PBS para remover células não aderidas. Em seguida, foi adicionado a cada poço 20 µl da solução de XTT e menadiona, na proporção 4:1, e 100 µl de PBS. Após 2h, foi observada alteração da cor resultado da reação, e feita leitura de absorbância a 490 nm (OD<sub>490</sub>) (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader; Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Todos os ensaios foram realizados sob condições assépticas e em duplicata.

Bem como na caracterização do biofilme multiespécie, para a formação de biofilme misto de *Candida albicans* e *Candida krusei* também foi realizado plaqueamento do conteúdo em meio Chromágar (placa de Petri 90x15 mm). Sendo assim, após retirar as placas da estufa e de forma paralela a avaliação de atividade

metabólica, o sobrenadante foi descartado e cada poço foi lavado com 100 µl de PBS, duas vezes. Depois foi adicionado 200 µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%) para raspar o biofilme formado e aderido no fundo do poço, conforme feito na caracterização. O conteúdo obtido foi diluído 2000 vezes e uma alíquota de 10 µl foi plaqueada em meio Chromágar, com auxílio de alça de Drigalski para realizar o espalhamento.

As placas de meio Chromágar foram levadas para estufa por 48h, a 37°C, em ar atmosférico.

### 3.4 BIOFILME FORMADO

Primeiramente, assim como foi nos demais experimentos, foi preparado um inóculo de cada espécie em solução salina estéril (NaCl 0,9%), cuja densidade celular final foi ajustada em câmara de Neubauer para  $10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>. Do mesmo modo à formação de biofilme, foi preparada uma suspensão mista de *C. albicans* e *C. krusei* e na mesma proporção (1:1).

Para se obter o biofilme multiespécie, desta solução mista uma alíquota de 25 µl foi inoculada numa placa de 96 poços com RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), num volume final de 200 µl e mantida em estufa bacteriológica por 24h, a 37°C em ar atmosférico.

Transcorrido este tempo, a placa foi retirada da estufa e o sobrenadante removido. Em seguida, cada poço foi lavado com 200 µl de PBS, duas vezes, para remover as células não aderidas ao biofilme.

Uma vez concluída a etapa de lavagem, foi preparado o meio de reação para a irradiação. Para o grupo controle (grupo 1), foi adicionado apenas salina estéril no poço, num volume final de 150 µl, enquanto nos demais foi adicionado salina e o FS. Os grupos de estudo foram definidos conforme listado abaixo:

- Grupo 1: controle, sem aplicação de luz ou de FS (L-FS-);
- Grupo 2: aplicação de luz, porém sem FS (L+FS-);
- Grupo 3: AT 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>, sem aplicação de luz (L-FS+0,05);
- Grupo 4: AT 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>, com aplicação de luz (L+FS+0,05);

- Grupo 5: AT 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, sem aplicação de luz (L-FS+0,1);
- Grupo 6: AT 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, com aplicação de luz (L+FS+0,1).

O uso de luz e do FS foram identificados pelas letras 'L' e 'FS', respectivamente, sendo a presença distinguida pelo sinal positivo (+) e a ausência pelo sinal negativo (-).

Sendo assim, nos grupos com AT, o FS foi adicionado nas concentrações finais de 0,05 e 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> e volume final também de 150 µl. Após a preparação do meio de reação as placas foram cobertas e mantidas no escuro por 10 minutos. Em sequência, deu-se continuidade aos experimentos e aplicação da TFD para os grupos estabelecidos.

Como fonte de luz foi utilizado LED (Diodo Emissor de Luz), nos mesmos parâmetros utilizados no crescimento e na formação de biofilme multiespécie.

Depois de feita a irradiação, aguardou-se 15 minutos e o meio de reação foi retirado e desprezado. Em seguida, cada poço foi lavado com 200 µl de PBS, três vezes, e foi feita a determinação da atividade metabólica e observação ao microscópio.

A atividade metabólica do biofilme formado se deu pela reação de redução do sal XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide sodium salt) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Para isto, uma alíquota de 20 µl da solução de XTT e menadiona 0,04 mM recém preparada, na proporção 9:1, foi acrescida a cada poço juntamente com 200 µl de PBS. Após 2h, observou-se resultado da reação, e foi feita leitura de absorbância a 490 nm (OD<sub>490</sub>) (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader; Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Os experimentos foram todos realizados em duplicata e sob condições assépticas.

Seguindo protocolo semelhante à formação de biofilme, também foi feito plaqueamento da raspagem do biofilme em meio Chromágar para contagem de UFCs, de forma paralela a avaliação de atividade metabólica.

Sendo assim, depois de lavar os poços com 200 µl de PBS, duas vezes, foi adicionado a cada um 200 µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%) para raspar o biofilme no fundo do poço. O material obtido foi diluído 2000 vezes e uma alíquota de 10 µl foi plaqueada em meio Chromágar (placa de Petri 90x15 mm), e o espalhamento feito com auxílio de alça de Drigalski.

As placas de meio Chromágar foram em seguida levadas para estufa bacteriológica por 48h, a 37°C, em ar atmosférico.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores apresentados correspondem as médias e os respectivos desvios padrão (DP) de experimentos realizados de forma independente e com, ao menos, seis repetições. A técnica estatística aplicada a de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey-Kramer, utilizado para múltiplas comparações. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

## 4 RESULTADOS

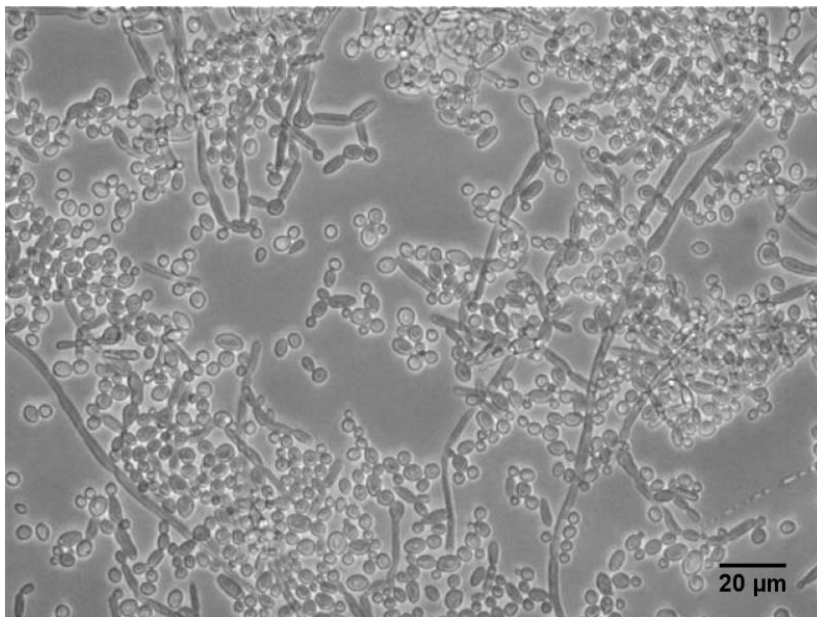
A princípio foram observados os dados de caracterização do biofilme multiespécie de *C. albicans* e *C. krusei* sem intervenções ou tratamentos.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME MULTIESPÉCIE

A caracterização do biofilme multiespécie permitiu esclarecer se ambas as espécies seriam capazes de crescer num mesmo ambiente, além de elucidar a hipótese de competição entre elas.

Neste caso, conforme pode ser observado na figura 1, é possível notar que o biofilme apresenta grande número de filamentos e algumas células livres.

Figura 1 – Caracterização de biofilme multiespécie formado.



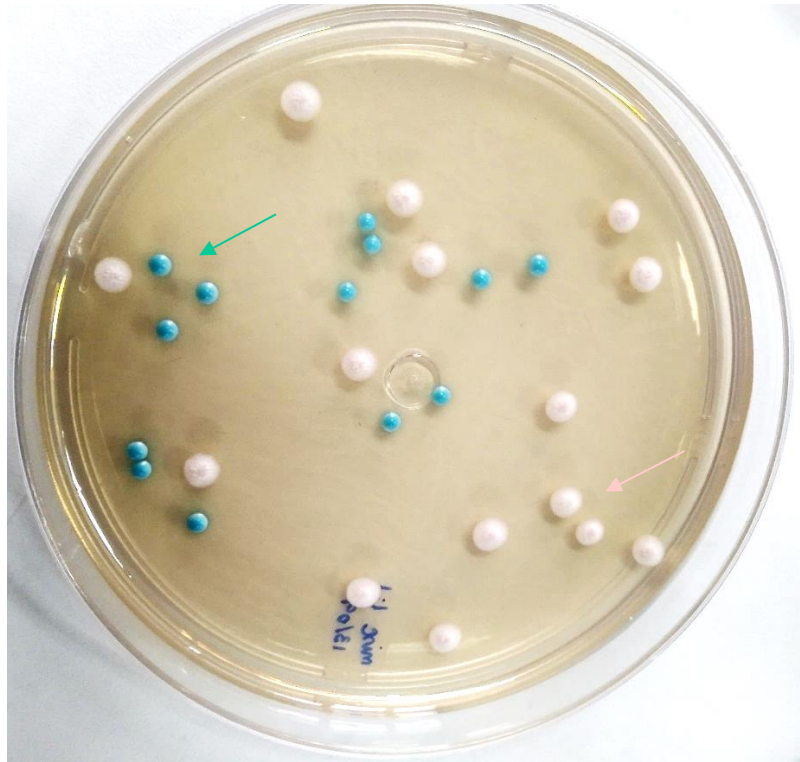
Fonte: autoral.

Nota: Observação do biofilme multiespécie formado ao microscópio.

Esta caracterização possibilitou observar que ao serem submetidas a um mesmo ambiente, houve sim formação do biofilme. Ademais, como forma de garantir que as espécies se encontravam em proporções iguais, foi feito plaqueamento da suspensão (diluída 1000 vezes) logo após seu preparo. O plaqueamento da

suspensão mista permitiu observar claramente que a proporção das espécies foi igual (1:1), conforme registrado na figura 2.

Figura 2 – UFCs/ml em meio Chromágar para caracterização de biofilme multiespécie.



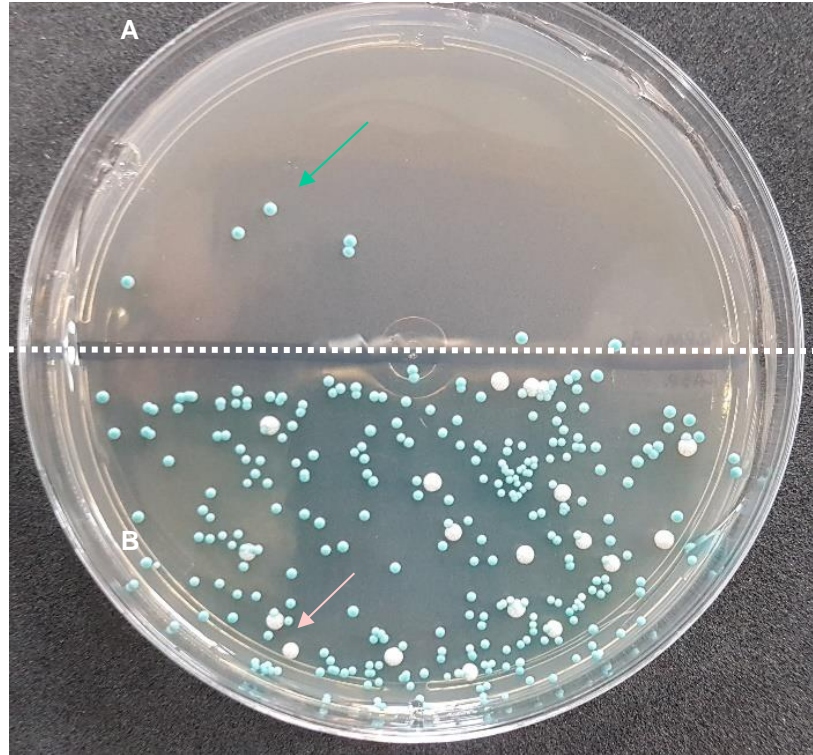
Fonte: autoral.

Nota: UFCs/ml em meio Chromágar (90x15 mm) oriundas do plaqueamento da suspensão mista diluída.

Colônia rosa (seta rosa) sugestiva de *C. krusei*.  
Colônia verde (seta verde) sugestiva de *C. albicans*.

Contudo, por meio da observação do conteúdo obtido do biofilme e plaqueado em meio Chromágar, notou-se que houve prevalência de *C. albicans* na contagem de UFCs, conforme indica a figura 3.

Figura 3 – UFCs/ml em meio Chromágar.



Fonte: autoral.

Colônia rosa (seta rosa) sugestiva de *C. krusei*.  
 Colônia verde (seta verde) sugestiva de *C. albicans*.  
 Lado A – Sobrenadante. Lado B – Raspagem.

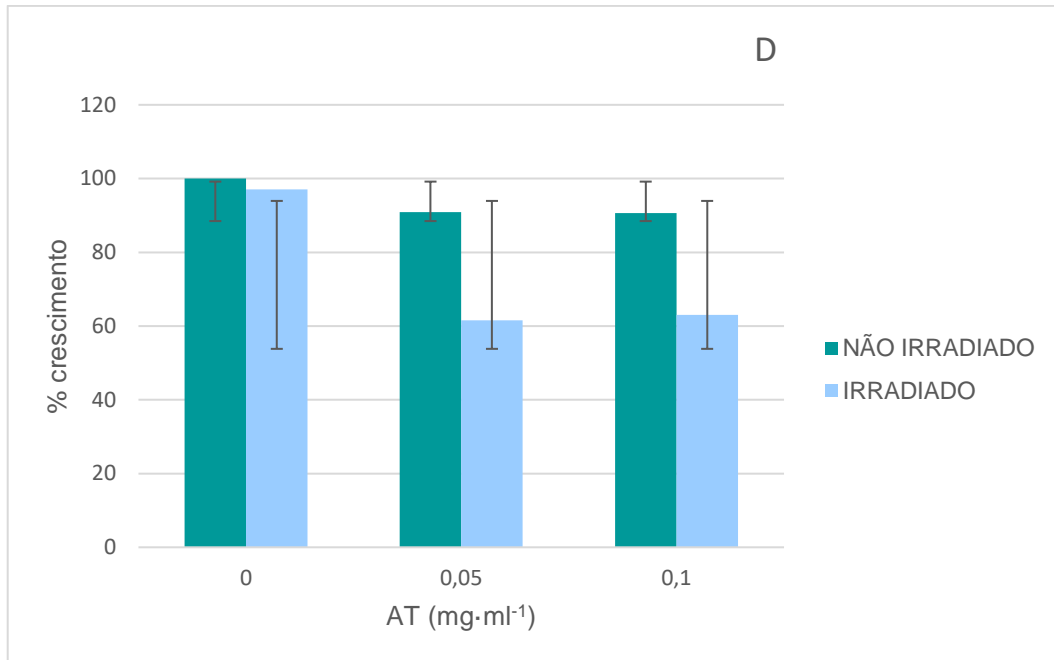
#### 4.2 CRESCIMENTO MULTIESPÉCIE APÓS TFD

O resultado do efeito da TFD sobre o crescimento misto de *C. albicans* e *C. krusei* foi observado após um período médio de 18 horas.

Foi observado que houve uma redução média de  $38,79\% \pm 15,76$  na concentração de  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  do AT e de  $35,26\% \pm 12,28$  para a concentração de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  do mesmo FS, grupos 4 (L+FS+) e 6 (L+FS+), respectivamente, em que houve irradiação, como pode ser evidenciado na figura 4.

Logo, pode-se notar ainda que para as duas concentrações utilizadas o resultado obtido foi semelhante. Além disso, para o grupo tratado apenas com a luz (Grupo 1), isto é, irradiação sem a presença de FS, não houve inibição do crescimento.

Figura 4 – Crescimento multiespécie após TFD.



Fonte: autoral.

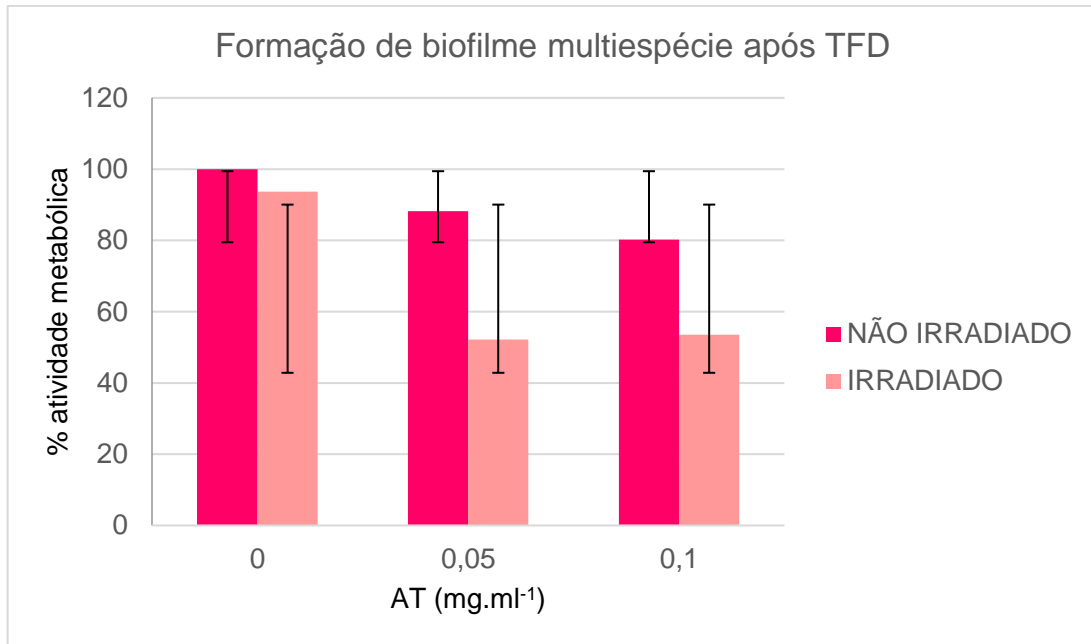
Pode-se afirmar ainda que para o grupo tratado somente com FS, em ambas as concentrações de 0,05 e 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, grupos 3 (L-FS+) e 5 (L-FS+), respectivamente, houve redução do crescimento multiespécie sem a aplicação da luz. Isto significa que o FS no escuro foi capaz de provocar uma resposta, mesmo que baixa em comparação aos demais grupos testados.

#### 4.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME MULTIESPÉCIE APÓS TFD

Primeiramente pode-se verificar os valores correspondentes a avaliação de atividade metabólica do biofilme formado após aplicação de TFD com AT, calculados com base no grupo controle, isto é, Grupo 1 – não tratado (fig. 5).

É possível notar que na concentração de AT de 0,05 mg·ml<sup>-1</sup> houve redução de 47,84% ± 12.02 na atividade metabólica do biofilme (Grupo 4: L+FS+). Enquanto na concentração de 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>, a redução da atividade metabólica corresponde a 46,52% ± 11.25 (Grupo 6: L+FS+).

Figura 5 – Porcentagem de atividade metabólica de formação de biofilme multiespécie após TFD.

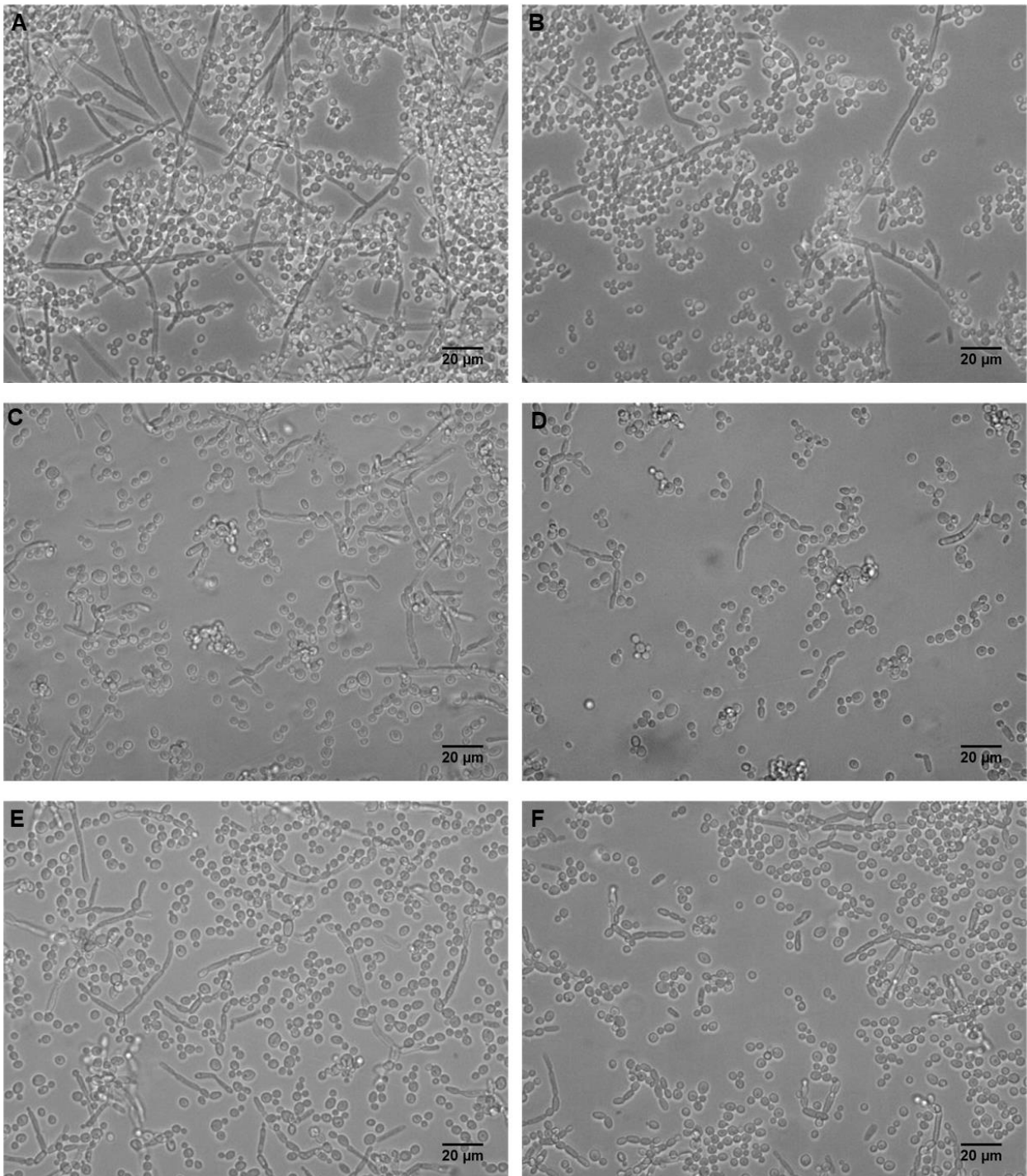


Fonte: autoral.

Além disso, pode-se notar que para os Grupos 1 (controle; L-FS-) e 2 (L+FS-), ou seja, sem tratamento com luz ou FS e ausência de FS, respectivamente, não houve inibição da formação do biofilme, indicando, mais uma vez, que para se obter o efeito desejado da TFD é preciso que todos os componentes necessários para a morte celular estejam presentes.

Tais resultados podem ser mais bem visualizados nas figuras a seguir.

Figura 6 – Formação de biofilme multiespécie após TFD.



Fonte: autoral.

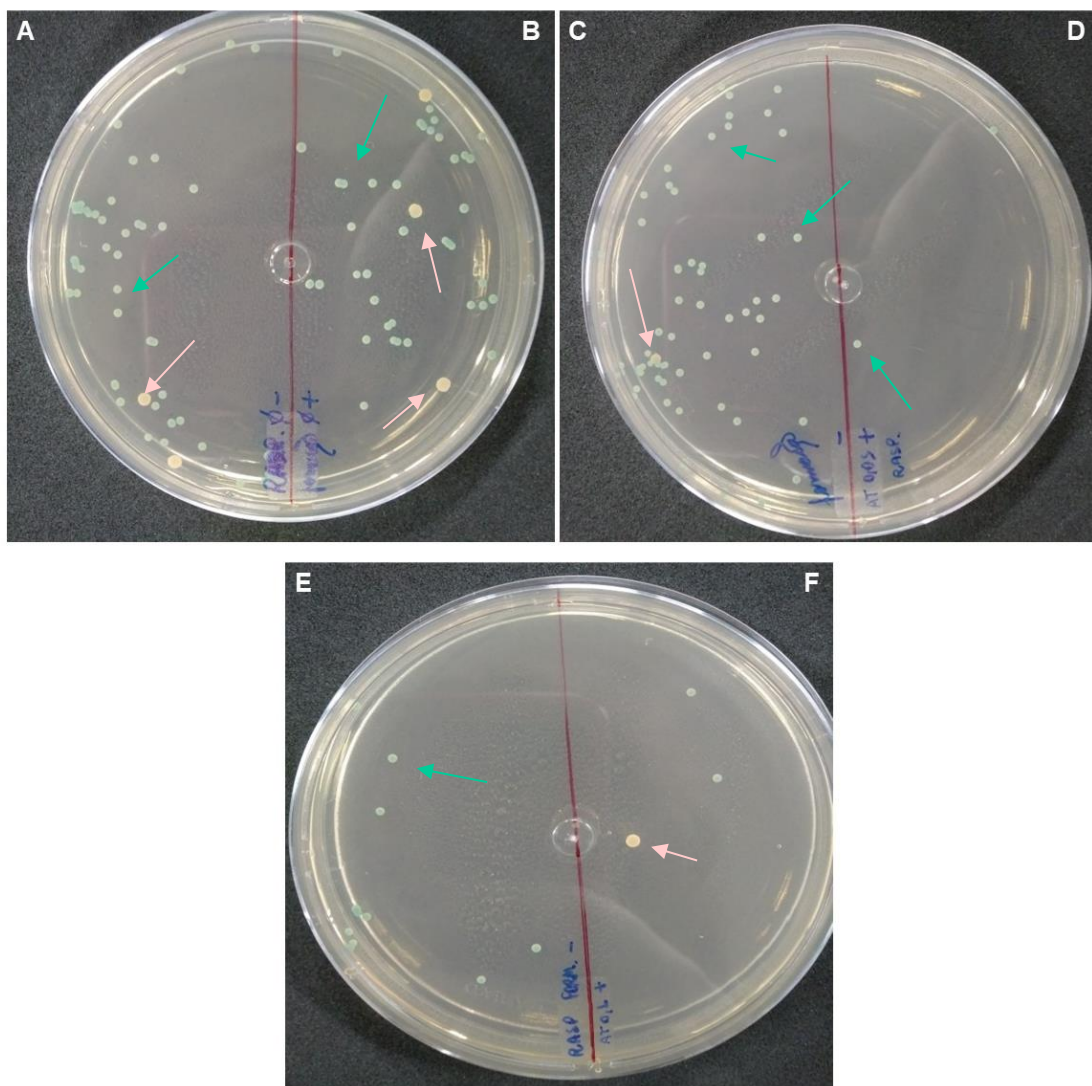
Legenda: A – Grupo 1 (controle; L-FS-). B – Grupo 2 (L+FS-). C – Grupo 3 (L-FS+0,05). D – Grupo 4 (L+FS+0,05). E – Grupo 5 (L-FS+0,1). F – Grupo 6

A partir da observação ao microscópio e das fotos dispostas na figura 6, pode-se inferir que após a irradiação, tanto no grupo 4 quanto no 6, (ambos L+FS+) e AT 0,05 e 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente, houve diminuição do número de células livres, mas também da quantidade filamentos no biofilme.

Pode-se notar ainda que na figura 6, na foto identificada como “E” há uma quantidade menor de filamentos se comparadas às fotos A e B. Com isto, sugere-se que isto pode ter ocorrido devido à presença do FS que pode ter prejudicado a formação do biofilme.

Ao mesmo tempo em que foi feita determinação de atividade metabólica, foi realizada a contagem de UFCs/ml da raspagem do biofilme em meio Chromágar, como pode ser visto na figura 7.

Figura 7 – UFCs/ml em meio Chromágar de formação de biofilme multiespécie após TFD.

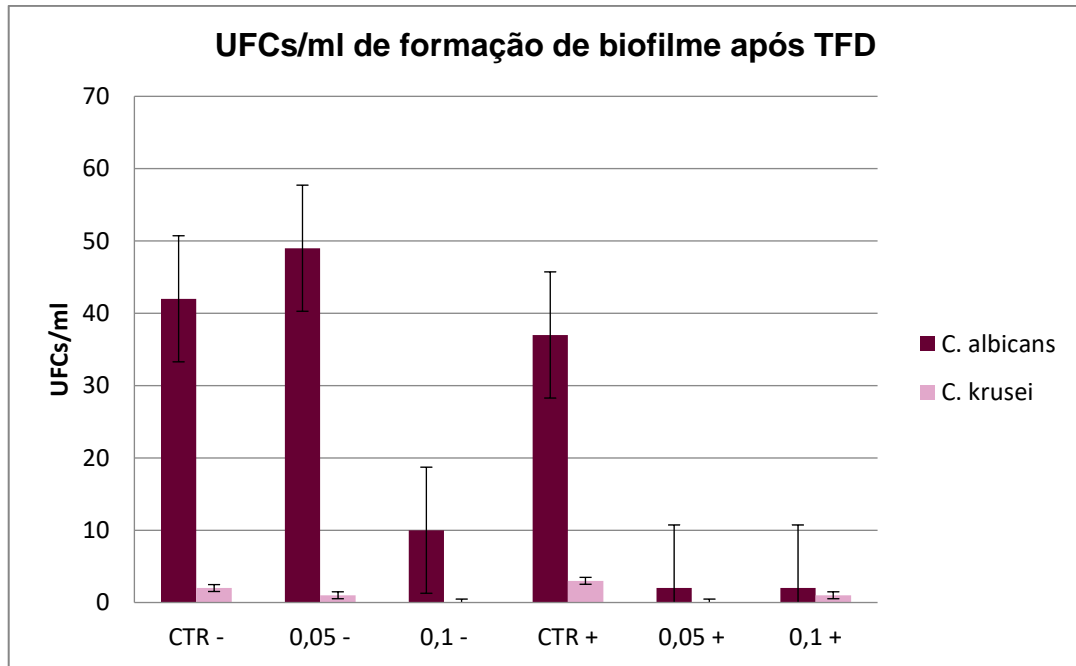


Fonte: autoral.

Legenda: A – Grupo 1 (controle; L-FS-). B – Grupo 2 (L+FS-). C – Grupo 3 (L-FS+0,05). D – Grupo 4 (L+FS+0,05). E – Grupo 5 (L-FS+0,1). F – Grupo 6 (L+FS+0,1).

Colônia rosa (seta rosa) sugestiva de *C. krusei*.  
Colônia verde (seta verde) sugestiva de *C. albicans*.

Figura 8 – Contagem de UFCs/ml em meio Chromágar de formação de biofilme multiespécie após TFD.



Fonte: autoral.

Tendo em vista as figuras 7 e 8, pode-se observar que, assim como visualizado na caracterização do biofilme multiespécie, há prevalência de colônias da espécie de *C. albicans* (colônia de cor verde).

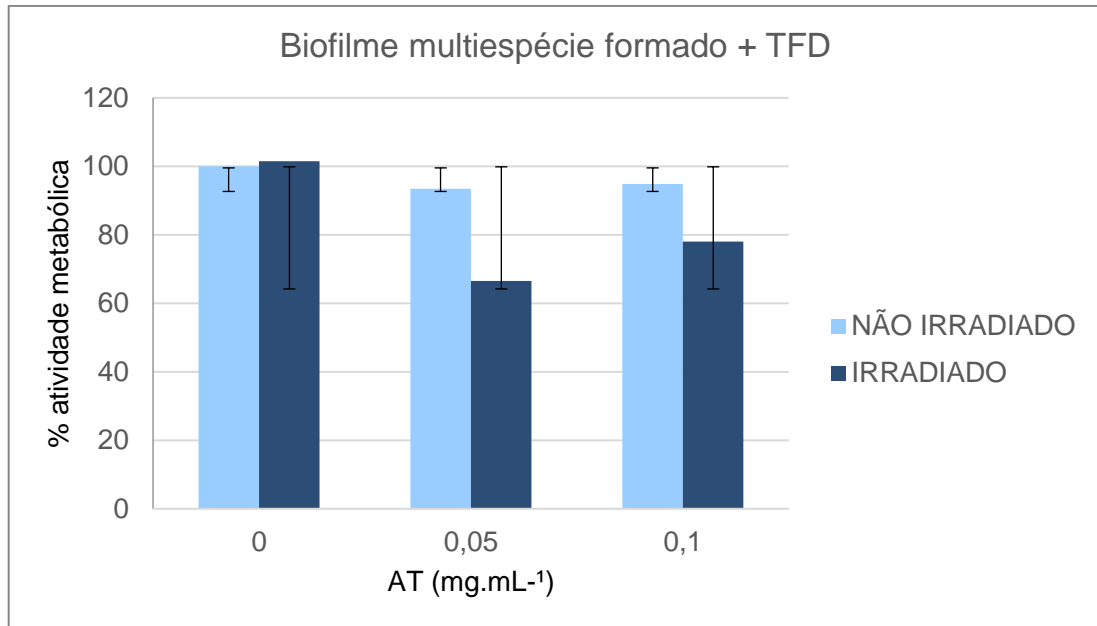
#### 4.4 BIOFILME MULTIESPÉCIE FORMADO APÓS TFD

Os efeitos da TFD sobre a atividade metabólica do biofilme multiespécie formado estão relatados a seguir.

Conforme ilustrado a seguir (figura 9), pode-se notar que a redução da atividade metabólica do biofilme multiespécie após aplicação da TFD foi de 33,44%  $\pm$  8.11 para a concentração de 0,05 mg·ml<sup>-1</sup> de AT (Grupo 4 – L+FS+) e de 22%  $\pm$  6.12 para a concentração de 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> de AT (Grupo 6 – L+FS+).

Deve-se notar ainda que os grupos 1 (L-FS-) e 2 (L+FS-), controle e aplicação da luz na ausência de FS, não apresentaram mudanças significativas na atividade metabólica. Isto significa que, a terapia e o FS isolados não foram capazes de alterar ou prejudicar a atividade metabólica do biofilme.

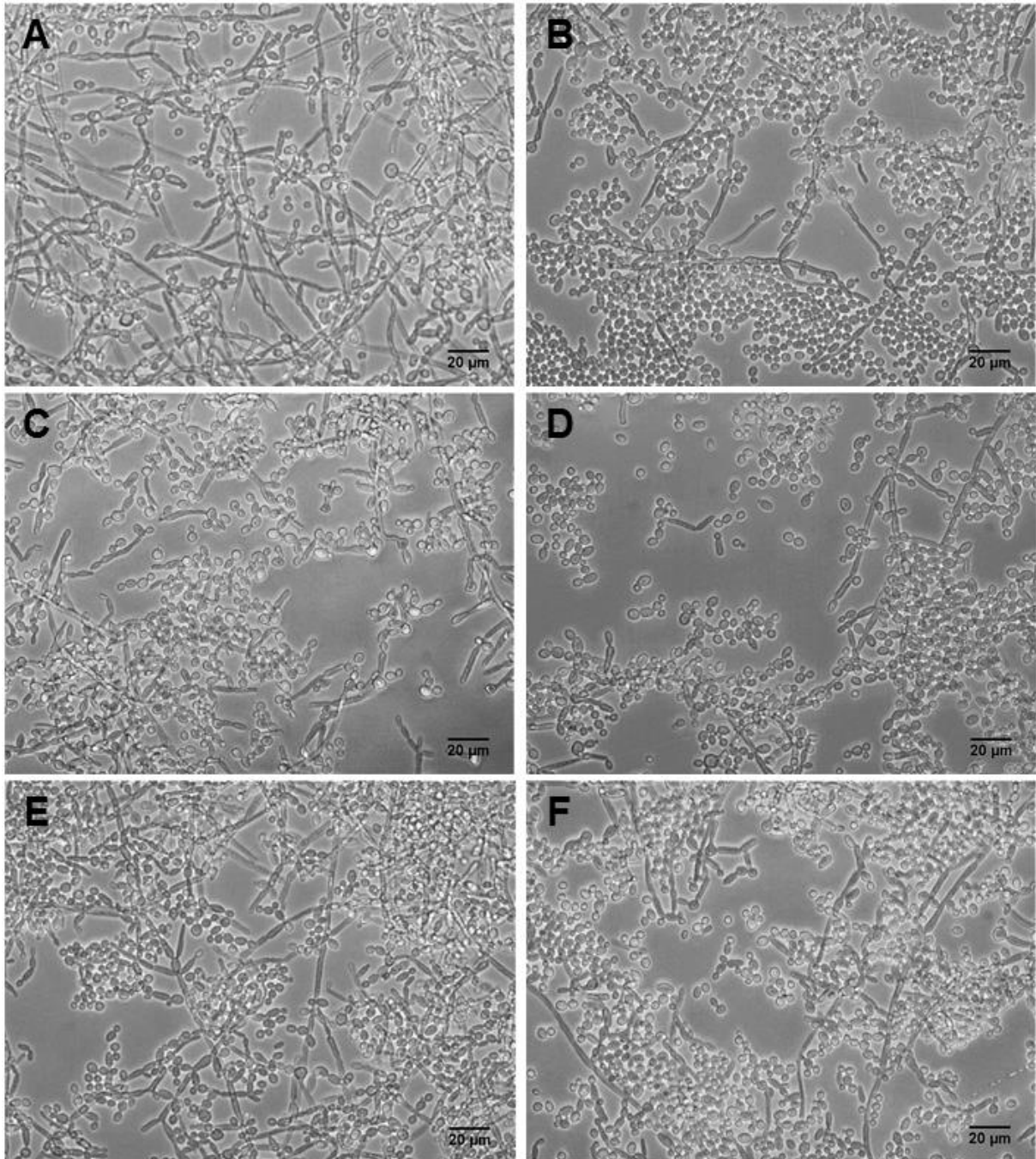
Figura 9 – Porcentagem de atividade metabólica de biofilme multiespécie formado após TFD.



Fonte: autoral.

Todavia, houve uma pequena redução no grupo 5 (L-FS+), que foi tratado apenas com o FS na concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Isto é, o FS foi capaz de alterar a atividade metabólica mesmo sem a aplicação da luz.

Figura 10 – Observação ao microscópio do biofilme multiespécie formado após TFD.



Fonte: autoral.

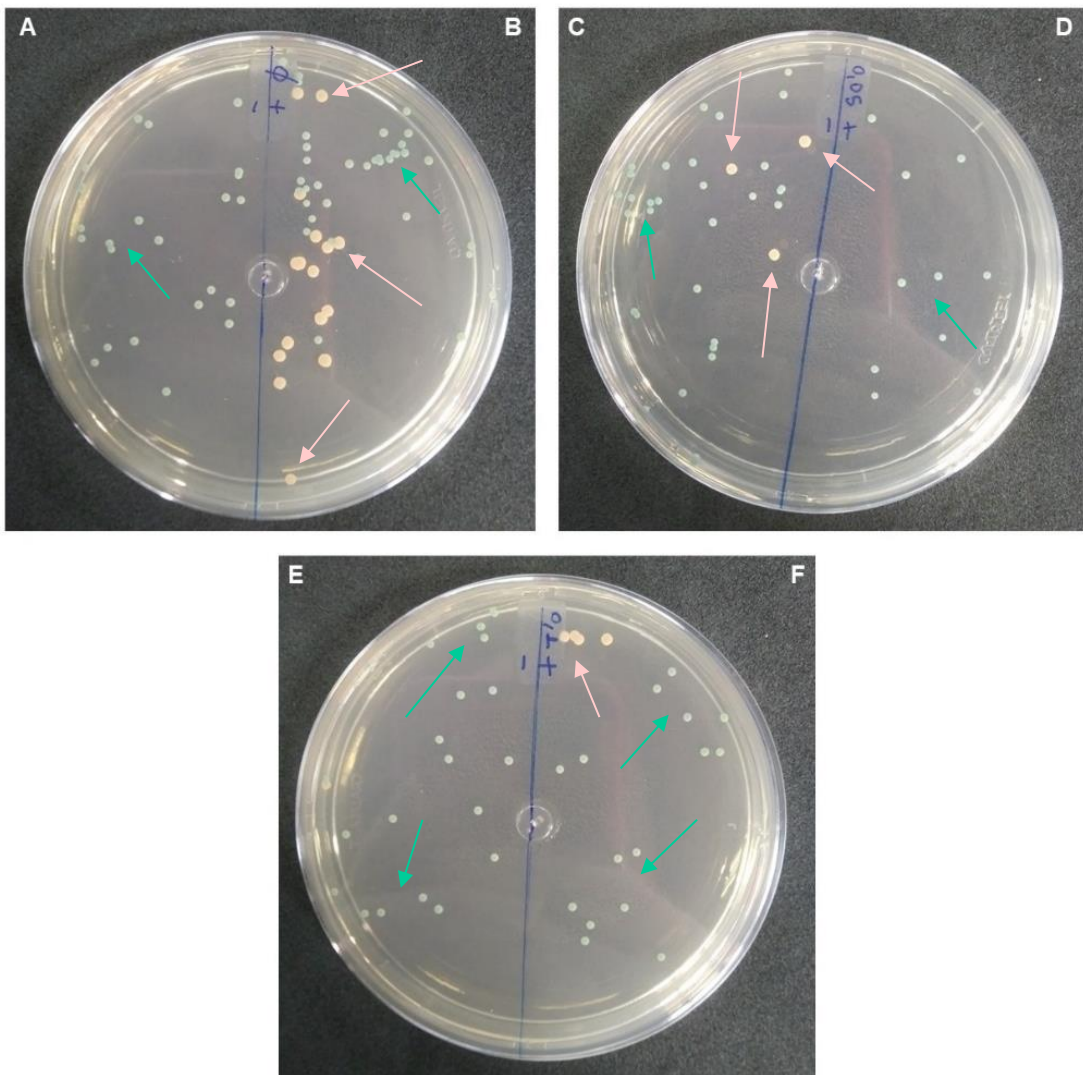
Legenda: A – Grupo 1 (controle; L-FS-). B – Grupo 2 (L+FS-). C – Grupo 3 (L-FS+0,05). D – Grupo 4 (L+FS+0,05). E – Grupo 5 (L-FS+0,1). F – Grupo 6 (L+FS+0,1).

Na figura 10 pode-se ver o biofilme multiespécie formado após a realização do tratamento com TFD em seus respectivos grupos. Estas fotos permitem sugerir que mesmo que baixa, há redução no número de filamentos se comparar o grupo 4 (L+FS+, sendo AT 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>) em relação ao grupo controle (L-FS-) e grupo 2 (L+FS-).

Porém, o mesmo não pode ser afirmado em relação ao grupo 6 (L+FS+) com AT  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , no qual não se observa diferença na quantidade de filamentos ou de células livres.

Na figura 11 estão dispostas as fotos das placas para contagem de UFCs/ml em meio Chromágar.

Figura 11 – UFCs/ml em meio Chromágar de biofilme multiespécie formado após TFD.

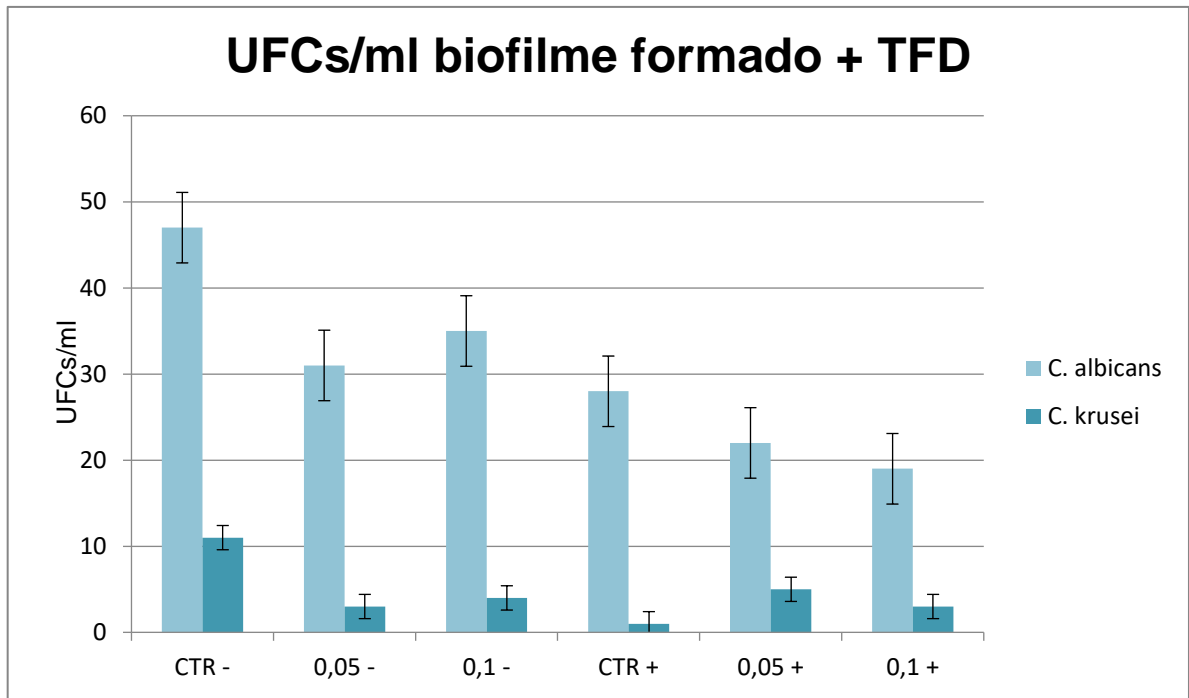


Fonte: autoral.

Legenda: A – Grupo 1 (controle; L-FS-). B – Grupo 2 (L+FS-). C – Grupo 3 (L-FS+0,05). D – Grupo 4 (L+FS+0,05). E – Grupo 5 (L-FS+0,1). F – Grupo 6 (L+FS+0,1).

Colônia rosa (seta rosa) sugestiva de *C. krusei*.  
Colônia verde (seta verde) sugestiva de *C. albicans*.

Figura 12 – Contagem de UFCs/ml em meio Chromágar de biofilme multiespécie formado após TFD.



Fonte: autoral.

É possível notar que há prevalência de colônias da espécie *C. albicans* (coloração verde) em todos os grupos estudados e evidenciado pela figura 12.

## 5 DISCUSSÃO

Biofilmes são estruturas complexas e que representam um grande desafio no tratamento de infecções, especialmente em âmbito hospitalar. Estudos já demonstraram que sua composição é essencial a sua resistência e virulência. Isto pode ser explicado pelo fato de que biofilmes, especialmente os fúngicos, são comunidades com elevado número populacional, compostos por células livres, hifas e pseudohifas, além de organizados de forma a manter um sistema de equilíbrio e proteção envolto por uma camada de matriz extracelular (RAO *et al.*, 2021; TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020 ).

As células presentes dentro do biofilme são fisiologicamente distintas das planctônicas, e apresentam maior resistência a ação de antimicrobianos convencionais disponíveis atualmente. Conseqüentemente, sua erradicação torna-se mais difícil, uma vez que a matriz extracelular impede tanto a penetração das drogas antifúngicas como a ação das células do sistema imunológico do hospedeiro (TITS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2020 ).

É sabido que algumas espécies do gênero *Candida* spp. vivem normalmente em comensalismo no corpo humano de indivíduos saudáveis. Contudo, em situações em que o sistema imune se encontra debilitado (pacientes hospitalizados, oncológicos ou que fazem uso de antibioticoterapia prolongada), estas pessoas estão sujeitas às infecções por estas leveduras que se aproveitam para se disseminar para outros sítios e de comensais passam a viver como patogênicos (DOVIGO *et al.*, 2010).

Os microrganismos causadores de doenças aos seres humanos já são estudados há dezenas de anos. Dentro deste contexto, as mais diferentes metodologias empregadas podem ser um obstáculo na comparação de resultados. Isto porque, torna-se dificultosa a comparação de resultados com metodologias tão distintas, especialmente tratando-se do fato de que, em estudos envolvendo biofilmes, na grande maioria deles os biofilmes multiespécie é composto por fungos e bactérias (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007)

O presente estudo teve por objetivo analisar o efeito da TFD com Azul de Toluidina sobre biofilme multiespécie formado de *C. albicans* e *C. krusei*, mas também seu efeito no crescimento e na formação de biofilme multiespécie após aplicação de TFD com AT em duas concentrações.

Os resultados obtidos demonstraram que a TFD foi capaz de reduzir tanto o crescimento quanto inibir a formação de biofilme misto de *C. albicans* e *C. krusei*, além de reduzir a atividade metabólica do biofilme formado após o tratamento. Este resultado também foi observado nos estudos propostos por Silva et al (2018) e Pinto et al (2018).

Da Silva e colaboradores (2018) relataram que a TFD promoveu diminuição no crescimento de *C. krusei*, além de inibir a formação de biofilme deste fungo. Contudo, este trabalho apresentou redução do crescimento e da formação de biofilme maiores que o presente estudo. Isto pode ser explicado pelo fato de, apesar de ambos terem empregado LED e o mesmo FS, a densidade de energia aplicada no estudo de Silva et al foi maior ( $40 \text{ J.cm}^{-2}$ ) (da Silva et al., 2018).

Sendo assim, como a densidade de energia foi maior, o efeito promovido pela irradiação foi dose-dependente. Ademais, não se pode desconsiderar o fato de que o presente estudo tratou dois microrganismos juntos, enquanto o de Da Silva et al (2018) tratou apenas um.

Os dados relatados por Pinto e colaboradores (2018) corroboram com os dados já discutidos no presente estudo. Pinto et al (2018) demonstrou a capacidade da TFD em reduzir a atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* em seus diferentes estágios de desenvolvimento, isto é, o biofilme em diferentes estágios de maturação. Assim como Rosseti e colaboradores (2014) destacaram o uso da TFD e seus efeitos na redução do crescimento e da formação de biofilme de *C. albicans*, um fungo já descrito como oportunista. Ambos foram bem-sucedidos na redução do crescimento, além de Rosseti, Chagas e Costa (2014) terem evidenciado aumento da produção de ROS e prejuízo à permeabilidade da membrana celular.

O presente estudo teve como foco o tratamento do biofilme multiespécie já maduro, ou seja, com 24h de formado. Enquanto Pinto et al (2018) e Rosseti, Chagas e Costa (2014) observaram que os efeitos da TFD dependem da dose e da

densidade de energia empregadas, assim como do tempo de maturação do biofilme (PINTO *et al.*, 2018; ROSSETI; CHAGAS; COSTA, 2014).

Trigo-Gutierrez e colaboradores (2018) empregaram em seu estudo um LED de 660 nm aplicado em biofilme multiespécie de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. Apesar da metodologia distinta, também foi observada a redução da atividade metabólica do biofilme mediante exposição a irradiação, mais uma vez, então, corroborando com o presente estudo e o que se sabe sobre a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica. Logo, a TFD promoveu redução de mais de 50% na atividade metabólica.

Entretanto, conforme evidenciado pelo próprio estudo não houve mudança na biomassa do biofilme. Isto pode ser mais bem compreendido pelo fato de que, em biofilmes formados por mais de uma espécie, a matriz extracelular é mais viscosa e isto, por sua vez, poderia indicar que ela é mais resistente à penetração do FS, dificultando a ação da TFD (TRIGO-GUTIERREZ *et al.*, 2018).

Este dado deve ser levado em consideração, especialmente ao comparar os dados do presente estudo com os relatados por Silva *et al.* (2018), Pinto *et al.* (2018) e Trigo-Gutierrez *et al.* (2018), nos quais a redução da atividade metabólica do biofilme formado e inibição da formação de biofilme foi maior que 50%.

O presente estudo obteve  $33,44\% \pm 15,76$  de redução da atividade metabólica do biofilme formado,  $47,88\% \pm 12,02$  na redução de formação de biofilme e  $38,79\% \pm 8,11$  de redução do crescimento multiespécie.

Carmello *et al.* (2017) também relatou sobre o uso de TFD, empregando um LED em biofilme misto de *C. albicans* associada à *C. glabrata* e *C. albicans* associada à *C. tropicalis*. Com isto, observou-se que a irradiação gerou pouca perturbação nos biofilmes, dado confirmado pela avaliação da biomassa do biofilme que pouco se alterou após tratamento com luz na presença de FS. Logo, sugeriu-se que a penetração do FS foi insuficiente (CARMELLO *et al.*, 2019)

Bapat e Nobile (2021) realizaram um estudo em que a TFD foi aplicada sobre biofilme maduro de *C. auris* utilizando como fonte de luz um LED vermelho e um LED verde, além de testar três FS distintos (AT, azul de metileno e rosa de bengala). Por meio da análise de atividade metabólica após irradiação e contagem

de UFCs do biofilme, foi registrada redução de aproximadamente 60% de inibição, sendo que com AT a perturbação do biofilme chegou a quase 76% (BAPAT; NOBILE, 2021).

Este resultado corrobora com o encontrado no presente estudo, mesmo que Bapat e Nobile (2021) tenham obtido uma porcentagem de inibição superior a encontrada nos ensaios com *C. albicans* e *C. krusei*. Isto pode se dar por alguns fatores, como, por exemplo, o meio utilizado para formar o biofilme que foi diferente.

Rodrigues e colaboradores (2013) relataram sobre o uso de TFD em células planctônicas de quatro espécies do gênero *Cândida*, incluindo *C. albicans* e *C. krusei*, além de empregar quatro diferentes FS. Foi demonstrado que a TFD foi útil na inibição do crescimento de todas as espécies tratadas, porém em comparação aos demais FS, o AT foi o que menos apresentou eficácia (RODRIGUES *et al.*, 2013).

O presente estudo verificou que a TFD foi capaz de levar à uma redução de quase 38% no crescimento multiespécie. Tal dado diverge do que foi encontrado por Rodrigues *et al.* (2013), em que a redução de sobrevivência de *C. albicans* e *C. krusei* foi de 59% e 91%, respectivamente.

A diferença nos resultados encontrados pode ser explicada, primeiramente, pelo fato de que o presente estudo tratou duas espécies concomitantemente. Isto, por si só, pode sugerir que o efeito da TFD seja diminuído, pois a população tratada foi maior.

Por outro lado, Pérez-Laguna e colaboradores (2021) constatou que *C. krusei* se apresenta mais resistente à ação da TFD. Em seu estudo, foi observado que apesar da terapia exercer efeito fungicida e reduzir a formação de colônias, diferentemente de outras espécies do gênero, a *C. krusei* necessitou de uma contração maior do FS para que se alcançasse resultado semelhante (PÉREZ-LAGUNA *et al.*, 2021).

Este dado discorda do encontrado no presente estudo, tendo em vista que *C. krusei* por meio da contagem de UFCs teve taxa de sobrevivência menor que *C. albicans*.

Quishida e colaboradores (2015) fizeram uso da TFD em biofilme multiespécie de *C. albicans*, *S. mutans* e *C. glabrata*. Foi observado que, de forma semelhante ao presente estudo, a TFD foi capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme, mas a contagem de UFCs e a avaliação da biomassa mostraram que tal redução não foi tão expressiva (QUISHIDA *et al.*, 2015).

Barros *et al.* (2016) encontrou dados semelhantes, e ainda sugeriu uma relação de competição entre ambas as espécies de leveduras, na qual *C. krusei* apresenta vantagem em relação ao crescimento, porém forma menos filamentos no biofilme misto se comparada à *C. albicans*. Assim como o estudo publicado por Santos *et al.* (2016), em que também se observou que quando submetidas à formação de biofilme multiespécie de *C. albicans* e de *C. krusei*, houve prevalência de UFCs de *C. albicans* no meio Chromágar.

Os trabalhos propostos por SANITÁ *et al.* (2018), ARAÚJO *et al.* (2007), RIBEIRO *et al.* (2010), COOKE *et al.* (2002) e SÁNCHEZ-VARGAS *et al.* (2013) também utilizaram Chromágar para diferenciação presuntiva de espécimes de *Candida* spp. empregadas em seus respectivos estudos. Este meio possui um substrato enzimático ( $\beta$ -glicosaminidase) em sua composição que, quando metabolizados pelas leveduras, fazem com que as colônias formadas adquiram colorações diferentes (COOKE *et al.*, 2002; DE ARAUJO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2010). Deste modo, conforme dados da literatura foi possível confirmar a veracidade e praticidade deste meio para a rápida identificação das colônias de *C. albicans* e de *C. krusei* utilizadas no presente estudo (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2013; SANITÁ *et al.*, 2018)

O presente estudo também verificou que a avaliação de atividade metabólica e a contagem de UFCs/ml em meio Chromágar não ofereceram resultados consistentes com o observado no microscópio. Isto porque, o observado no microscópio indicou redução menor do que o observado em meio Chromágar, onde sequer houve formação de algumas colônias em alguns ensaios.

Ademais, é de suma importância destacar as limitações do presente estudo.

Biofilmes são, conforme já mencionado, estruturas complexas e que apresentam diversas camadas de células, além de uma matriz extracelular que

promove proteção em relação ao meio externo e condições extremas de sobrevivência para o microrganismo.

Deste modo, é imprescindível ressaltar que devido sua complexa estrutura, o uso da TFD pode não ser capaz atingir a todas as camadas do biofilme. Assim também como deve-se mencionar que o FS pode não ser capaz de penetrar tais camadas mais profundas e, assim, muitas células do biofilme permaneçam intactas após a irradiação, como sugerido por Quishida *et al.* (2015) e Trigo-Gutierrez *et al.* (2018).

Esta característica do biofilme também pode limitar a avaliação de atividade metabólica por meio da reação de redução de XTT. Isto porque, em sua complexa estrutura há células em estado de latência ou que se encontram em camadas muito profundas, dificultando uma análise mais verdadeira (QUISHIDA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016).

Em relação a contagem de UFCs, vale ressaltar que o processo para obtenção das células pode gerar danos às mesmas. Isto porque a raspagem do biofilme não garante que todas as células foram raspadas e obtidas sem causar seu rompimento e modificação estrutural. Sem contar que, é uma etapa que demanda tempo e pode apresentar outras variáveis próprias, como as da diluição, levando a variações no número final de células obtidas (CARMELLO *et al.*, 2017; DOVIGO *et al.*, 2010; QUISHIDA *et al.*, 2015).

A divergência de resultados em relação a redução da atividade metabólica do biofilme multiespécie formado pode ser atribuída ao fato de que, no atual estudo, para o FS na concentração de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  os parâmetros empregados na irradiação podem não ter sido os ideais para se obter redução mais significativa. Tendo em vista que, para obter o melhor resultado na aplicação da TFD, é preciso que o FS escolhido esteja numa concentração também ideal para o comprimento de onda e densidade de energia escolhidos.

Deste modo, apesar de a redução da atividade metabólica do biofilme multiespécie ser inferior ao que se encontra na literatura, é necessário ressaltar que biofilmes representam um grande desafio para a área médica e torna-se difícil comparar de forma justa estudos com metodologias tão distintas entre si.

Apesar disso, a TFD continua a ser uma técnica segura e eficaz na redução da sobrevivência de diversas espécies de microrganismos, como apontado nos resultados descritos neste estudo.

## 6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, com base nos dados obtidos no presente estudo, a TFD com azul de toluidina exerceu efeito sobre o biofilme multiespécie formado, promovendo redução de sua atividade metabólica.

Além disso, reduziu o crescimento e a formação de biofilme multiespécie.

## REFERÊNCIAS

- ASTUTY, S. D. *et al.* The Efficacy of Photodynamic Inactivation of the Diode Laser in Inactivation of the *Candida albicans* Biofilms With Exogenous Photosensitizer of Papaya Leaf Chlorophyll. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 215–224, 6 jul. 2019.
- ATIENCIA-CARRERA, M. B. *et al.* Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 17, n. 2, p. e0263522, 3 fev. 2022.
- BAPAT, P. S.; NOBILE, C. J. Photodynamic Therapy Is Effective Against *Candida auris* Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 3 set. 2021.
- BARROS, P. P. *et al.* Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression in in vitro biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 64, p. 92–101, 1 abr. 2016.
- CAI, Z. *et al.* Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, n. November 2018, p. 382–388, 2019.
- CARMELLO, J. C. *et al.* Corrigendum to “Photoinactivation of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species using Photodithazine®” [Photodiagn. Photodyn. Ther. 17C (2017) 194–199]. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 288, 1 dez. 2017.
- CARMELLO, J. C. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy reduces adhesion capacity and biofilm formation of *Candida albicans* from induced oral candidiasis in mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 402–407, 1 set. 2019.
- CAROLUS, H.; VAN DYCK, K.; VAN DIJCK, P. ***Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome.** **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 18 set. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6759544/>. Acesso em: 1 jun. 2021
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. ***Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies.** **Frontiers in Medicine** Frontiers Media S.A., , 1 fev. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5816785/>. Acesso em: 1 jun. 2021
- COOKE, V. M. *et al.* New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3622–3627, 2002.
- COSTA, A. C. B. P. *et al.* Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 11, p. 1299–1305, nov. 2011.
- DA 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, 1 jul. 2018.

DA SILVA PASSOS, J. C. *et al.* Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue (TBO) inhibits both growth and dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis* by a mechanism involving reactive oxygen species (ROS) production. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 421–424, 1 mar. 2019.

DE ARAUJO, C. R. *et al.* IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* POR MÉTODOS MANUAIS CONVENCIONAIS PELO MÉTODOCROMÓGENO CHROMAGAR CANDID. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, 25 out. 2007.

DE 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, 6 jul. 2017.

DOVIGO, L. N. *et al.* Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem®. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 42–49, mar. 2010.

EL-AZIZI, M. A.; STARKS, S. E.; KHARDORI, N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms\*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1067–1073, 1 maio 2004.

FARIA, D. R. *et al.* Promising antifungal activity of new oxadiazole against *Candida krusei*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, 2020.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. <p>Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of <em>*Candida krusei*</em>, a Neglected Fungal Pathogen</p>. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 1673–1689, jun. 2020.

GÜZEL TUNCCAN, Ö. *et al.* The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, v. 48, n. 4, p. 873–879, 16 ago. 2018.

HACIOGLU, M. *et al.* Effects of ceragenins and conventional antimicrobials on *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* mono and multispecies biofilms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 3, p. 114863, 1 nov. 2019.

LEITE, D. P.; PIVA, M. R.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 44, n. 1, p. 12–17, fev. 2015.

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, 3 jan. 2018.

MAJEWSKI, M.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C. Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana em leveduras do gênero *Candida*. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 663–669, 19 ago. 2014.

MISHRA, R. *et al.* Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2640, 29 out. 2020.

- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, 1 mar. 2016.
- PÉREZ-LAGUNA, V. *et al.* In Vitro Effect of Photodynamic Therapy with Different Lights and Combined or Uncombined with Chlorhexidine on *Candida* spp. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1176, 30 jul. 2021.
- PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, ago. 2007.
- 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, 2 jan. 2021.
- PRAŽYŇSKA, M.; GOSPODAREK, E. In Vitro Effect of Amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* Biofilm Formation. **Mycopathologia**, v. 177, n. 1–2, p. 19–27, 2014.
- 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, 3 fev. 2015.
- RAO, H. *et al.* molecules Approaches for Mitigating Microbial Biofilm-Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies. **Molecules**, v. 26, p. 1870, 2021.
- RIBEIRO, P. M. *et al.* Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*. **Brazilian Dental Science**, v. 12, n. 4, 31 ago. 2010.
- RICARDO, E. *et al.* Mechanisms of acquired in vivo and in vitro resistance to voriconazole by *Candida krusei* following exposure to suboptimal drug concentration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, 2020.
- RODRIGUES, G. B. *et al.* In vitro photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 2, p. 141–149, 1 maio 2013.
- 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, 1 maio 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**, p. 1608–1614, 2021.

SALAZAR, S. B. *et al.* An Overview on Conventional and Non-Conventional Therapeutic Approaches for the Treatment of Candidiasis and Underlying Resistance Mechanisms in Clinical Strains. **Journal of Fungi 2020, Vol. 6, Page 23**, v. 6, n. 1, p. 23, 10 fev. 2020.

SALEHI, B. *et al.* Management of Streptococcus mutans-Candida spp. Oral Biofilms' Infections: Paving the Way for Effective Clinical Interventions. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 517, 14 fev. 2020.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **J. Med. Microbiol**, v. 41, p. 295–310, 1994.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. *et al.* Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 10, p. 1318–1326, 2013.

SANITÁ, P. V. *et al.* Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 4, p. 709–717, 13 maio 2018.

SANTOS, J. D. DOS *et al.* Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, 15 mar. 2016.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60047, 28 mar. 2013.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 08, n. JAN, 23 jan. 2017.

SCORZONI, L. *et al.* Current and promising pharmacotherapeutic options for candidiasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 22, n. 7, p. 887–888, 3 maio 2021.

SHE, P. *et al.* Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 88–101, 1 jan. 2020.

SOUSA, A. S. *et al.* Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 111–114, 1 jun. 2016.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 12, p. 1200–1208, 1 dez. 2007.

TITS, J.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Combination Therapy to Treat Fungal Biofilm-Based Infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8873, 23 nov. 2020.

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, 1 dez. 2018.

VILA, T. *et al.* Therapeutic implications of *C. albicans*-*S. aureus* mixed biofilm in a murine subcutaneous catheter model of polymicrobial infection. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 835–851, 2021.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13–28, 1 jul. 1998.

WIENCH, R. *et al.* Assessment of sensitivity of selected *Candida* strains on antimicrobial photodynamic therapy using diode laser 635 nm and toluidine blue – In vitro research. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 241–247, set. 2019.