



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

SIMONE APARECIDA BIAZZI DE LAPENA

**ASSOCIAÇÃO DA QUITOSANA À TERAPIA FOTODINÂMICA PARA
CONTROLE DE *Candida albicans*: estudo em culturas
planctônicas, biofilmes e células persistentes**

2021

SIMONE APARECIDA BIAZZI DE LAPENA

**ASSOCIAÇÃO DA QUITOSANA À TERAPIA FOTODINÂMICA PARA CONTROLE
DE *Candida albicans*: estudo em culturas planctônicas, biofilmes e células
persistentes**

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

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

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Lapena, Simone Aparecida Biazzi de

Associação da quitosana à terapia fotodinâmica para controle de *Candida albicans*: estudo em culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes / Simone Aparecida Biazzi de Lapena. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

53 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. *Candida albicans*. 3. Quitosana. 4. Azul de metileno. 5. Células persistentes. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Vania Maria Maciel Melo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Departamento de Biologia

Campus Fortaleza

Profa. Dra. Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo

Universidade Paulista (UNIP)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Newton Soares da Silva

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 8 de outubro de 2021.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Edislei de Lapena** pelo amor, apoio e compreensão que tenho recebido por todos esses anos que estamos vivendo a história que Deus escolheu para nós.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora **Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira**, por ter acreditado em mim, por toda a dedicação e pelo respeito o qual sempre teve comigo. Minha admiração, gratidão e carinho pela senhora só têm aumentado a cada dia. Sempre estará presente nas minhas mais doces lembranças.

À amiga que o doutorado me presenteou, **Maíra Terra Garcia**, pela paciência, dedicação, confiança e apoio. Você me ofereceu todo o suporte para o desenvolvimento desta pesquisa, ensinou, explicou, corrigiu e vibrou com todas as minhas conquistas. Você foi fundamental nessa etapa da minha vida, estará guardada no meu coração.

Ao amigo **Lucas de Paula Ramos**, por ter me incentivado na realização desse sonho, por todo o apoio nos momentos de dificuldades e pelos bons conselhos.

À **Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira**, pelo carinho e respeito a qual me acolheu, compreendendo minhas dificuldades e, principalmente, por ter oferecido uma nova oportunidade na realização do meu sonho.

À minha irmã **Rita de Cássia Biazzi de Lima**, por ter sido a primeira pessoa a acreditar no meu potencial, pelo incentivo a realizar a minha primeira graduação e muito, muito antes disso tudo, por ter se esforçado em

oferecer a mim o que você não pode ter.

Aos meus pais **Antonio Biazzi e Neide Minari Biazzi**, por terem me dado a vida e por sentirem orgulho das minhas conquistas.

Aos meus filhos **Edislei Biazzi de Lapena e Eduardo Biazzi de Lapena**, por ser a minha verdadeira inspiração. Pelos carinhos recebidos enquanto eu estudava, pela paciência em escutar as minhas descobertas, pelos cafezinhos oferecidos nas noites dedicadas a esse trabalho e por toda a compreensão nos meus momentos de dificuldades.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp na pessoa da diretora do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos, **Profa Assoc. Rebeca Di Nicoló** e do vice-diretor **Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho**, minha gratidão pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicada a Saúde Bucal, na pessoa do Coordenador **Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges**, meu muito obrigada.

Aos **docentes** do Programa em Ciências Aplicada a Saúde Bucal, pela competência, acolhimento e por todo o auxílio oferecido.

À **equipe da Biblioteca** pelo auxílio durante toda a minha jornada acadêmica e pela elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.

À **Profa. Dra. Vania Maria Maciel Melo**, da Universidade Federal do Ceará, que colaborou com a produção da quitosana para realização desse trabalho.

Ao **Rodnei Dennis Rossoni** pelos ensinamentos sobre células persistentes, pelo apoio oferecido todas às vezes que precisei de sua ajuda, sempre de forma carismática.

À amiga **Renata Mendonça Moraes** por todo o auxílio durante as disciplinas, nas elaborações das apresentações de trabalhos, pelas conversas de incentivo desde o primeiro dia que nos conhecemos na Unesp.

Às minhas colegas que muito contribuíram na minha jornada e por me acolherem com tanto carinho, **Liliana, Jéssica, Livia, Evelyn e Patrícia**.

Ao **Rafael** que auxiliou durante as atividades realizadas no laboratório.

À **Hanna Flávia** que esteve comigo nos estudos e realizações de atividades durante as disciplinas iniciais. Gratidão imensa pelo carinho que me ofertou durante meu período de enfermidade.

Aos meus colegas da copa que dividiram comigo muitas conversas agradáveis, trocas de conhecimentos, ensaios de seminários, discussões de conteúdos de avaliações e, principalmente, muita comida saborosa. **Keila, Anderson, Bruna, Nayara e Cheyenne**.

A toda equipe da portaria e à equipe de serviços gerais pela simpatia e cordialidade.

A todos os colegas que estiveram comigo nas diferentes etapas dessa jornada, seja em sala de aula ou no laboratório.

Ao meu coordenador geral da Unip **Prof. Alípio de Oliveira do Carmo** pela colaboração e compreensão na redução da minha jornada de trabalho para a realização deste estudo, mostrando-se um grande incentivador da realização desse meu sonho.

Ao diretor do Ites, **Prof. Izidro José de Paiva Medeiros** pela compreensão e apoio nos momentos de redução de carga horária para a realização desse trabalho. Pelas conversas e conselhos de uma pessoa que respeito como um "pai".

Aos meus colegas de trabalho da Unip e do Ites que contribuíram imensamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga irmã que sempre está ao meu lado, **Fernanda Malagutti Tomé**.

A todos os amigos que permaneceram ao meu lado e que continuaram a aplaudir as minhas conquistas e vitórias.

Àquele que a tudo permite que aconteça na minha vida, me ama incondicionalmente, oferta a determinação para vencer os obstáculos e permanecer firme, ao meu criador, gratidão pela generosidade de **Deus**, por mim.

*Mudaste o meu pranto em dança,
a minha veste de lamento em veste de alegria,
para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale,
Senhor, meu Deus,
eu te darei Graças para sempre!
Salmos 30:11-12*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Cepas de <i>C. albicans</i>	23
3.2 Fotossensibilizador e fonte de luz	23
3.3 Preparo da solução de quitosana	23
3.4 Grupos experimentais.....	24
3.5 Terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de <i>C. albicans</i>	24
3.5.1 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i>	24
3.5.2 Fotossensibilização em culturas planctônicas	25
3.5.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)	25
3.6 Terapia fotodinâmica sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	26
3.6.1 Formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	26
3.6.2 Fotossensibilização do biofilme de <i>C. albicans</i>	27
3.6.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)	27
3.7 Terapia fotodinâmica sobre células persistentes de <i>C. albicans</i>	27
3.8 Análise da absorção do fotossensibilizador pelas células de <i>C. albicans</i> ..	28
3.9 Análise estatística	29
4 RESULTADO	30
4.1 Ação da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de <i>C. albicans</i>	30
4.2 Ação da terapia fotodinâmica em biofilmes de <i>C. albicans</i>	32
4.3 Ação da terapia fotodinâmica em células persistentes de <i>C. albicans</i>	34
4.4 Análise da absorbância do fotossensibilizador pelas células de <i>C. albicans</i>	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

Lapena SAB. Associação da quitosana à terapia fotodinâmica para controle de *Candida albicans*: estudo em culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) vem se mostrando como um método eficaz no controle de micro-organismos patogênicos, sendo investigada para o tratamento de diversas doenças infecciosas, como a candidose bucal. Recentemente, alguns agentes potencializadores dessa terapia têm sido estudados, incluindo a Quitosana (QT), um polímero natural extraído do exoesqueleto de crustáceos. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito potencializador da QT na TFD mediada pelo fotossensibilizador Azul de Metileno (AM) sobre cepas de *Candida albicans*, investigando sua ação em culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes ao fluconazol. Além disso, foi avaliado a capacidade da QT em interferir na absorção do AM pelas células de *Candida*. Foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*, sendo uma padrão (ATCC 18804) e uma clínica isolada de candidose orofaríngea (70). Para os ensaios em culturas planctônicas, as cepas de *C. albicans* foram cultivadas em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) por 24 horas. Os biofilmes foram formados por 48 horas no fundo das placas de 96 poços. Para indução de células persistentes, *C. albicans* foi cultivada com altas concentrações de fluconazol por 48 horas. A seguir, foram realizados os tratamentos com QT a 5 mg/mL (pH de 6,5), AM nas concentrações de 300 ou 600 μ M, e irradiação com LED (660 nm) na densidade de energia de 30 J/cm². Foram incluídos oito grupos experimentais: TFD com AM e QT na presença de Luz (AM+QT+L+), AM e QT sem Luz (AM+QT+L-), QT e Luz (QT+L+), QT sem Luz (QT+L-), TFD com AM e Luz (AM+L+), AM sem Luz (AM+L-), Solução Fisiológica com Luz (F-L+) e apenas Solução Fisiológica (F-L-). Após os tratamentos, foi realizada contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Para determinar a absorção do fotossensibilizador pelas células de *C. albicans*, as células foram lisadas e centrifugadas para leitura da densidade óptica. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05\%$). Na TFD em culturas planctônicas, o AM (300 μ M) reduziu as células de *Candida* em 1,6 log (UFC/mL), enquanto que a associação AM+QT levou à redução de 4,7 log. Na TFD em biofilmes, ocorreu redução microbiana de 2,9 log para o tratamento com AM (600 μ M) e de 5,3 log para AM+QT. Em relação às células persistentes, a redução encontrada foi de 0,8 log para AM e 1,5 log para AM+QT. No teste de absorção, a penetração do AM nas células de *Candida* (DO 0,02) foi aumentada na presença da QT (DO 0,39). Concluiu-se que a QT potencializou o efeito antimicrobiano da TFD em culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes de *C. albicans*, provavelmente por facilitar a penetração do AM nas células fúngicas.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. *Candida albicans*. Quitosana. Azul de metileno. Células persistentes.

Lapena SAB. Association of chitosan and photodynamic therapy to control Candida albicans: study in planktonic cultures, biofilms and persister cells [thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has been shown to be an effective method to control pathogenic microorganisms, being investigated for the treatment of several infectious diseases, such as oral candidiasis. Recently, some agents that enhance this therapy have been studied, including Chitosan (CS), a natural polymer extracted from the exoskeleton of crustaceans. The aim of this study was to evaluate the potentiating effect of CS on Methylene Blue (MB) photosensitizer-mediated PDT on Candida albicans strains, investigating its action on planktonic cultures, biofilms and persister cells to fluconazole. In addition, the ability of CS to interfere with MB absorption by Candida cells was evaluated. Two strains of C. albicans were used, one standard (ATCC 18804) and one isolated clinical of oropharyngeal candidosis (70). For assays in planktonic cultures, C. albicans strains were cultivated in Yeast Nitrogen Base broth (YNB) for 24 hours. Biofilms were formed for 48 hours at the bottom of 96-well plates. For the induction of persister cells, C. albicans was cultivated with high concentrations of fluconazole for 48 hours. Next, treatments were performed with CS at 5 mg/mL (pH 6.5), MB at concentrations of 300 or 600 μ M, and irradiation with LED (660 nm) at an energy density of 30 J/cm². eight experimental groups were included: PDT with MB and CS in the presence of Light (MB+CS+L+), MB and CS without Light (MB+CS+L-), CS and Light (CS+L+), CS without Light (CS +L-), PDT with MB and Light (MB+L+), MB without Light (MB+L-), Physiological Solution with Light (F-L+) and Physiological Solution only (FL-). After the treatments, colony forming units (CFU/mL) were counted. To determine the absorption of the photosensitizer by C. albicans cells, the cells were lysed and centrifuged for optical density reading. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test ($p < 0.05\%$). In PDT in planktonic cultures, MB (300 μ m) reduced Candida cells by 1.6 log (CFU/mL), while the MB+CS association led to a 4.7 log reduction. In PDT in biofilms, there was a microbial reduction of 2.9 log for the treatment with MB (600 μ m) and of 5.3 log for MB+CS. Regarding persister cells, the reduction found was 0.8 log for MB and 1.5 log for MB+CS. In the absorption test, the penetration of MB into Candida cells (OD 0.02) was increased in the presence of CS (OD 0.39). It was concluded that CS potentiated the antimicrobial effect of PDT in planktonic cultures, biofilms and persister cells of C. albicans, probably by facilitating the penetration of MB into fungal cells .

Keywords: Photodynamic therapy. Candida albicans. Chitosan. Methylene blue. Persister cells.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal contém a maior diversidade de micro-organismos entre todos os habitats microbianos humanos, que podem colonizar e formar biofilmes em diferentes superfícies, como os dentes, mucosa bucal, dorso da língua e sulco gengival (Kilian et al., 2016; Sharma et al., 2018). Esses diferentes nichos ecológicos oferecem condições específicas em termos de aderência, disponibilidade de nutrientes e teor de oxigênio, diversificando assim as composições microbianas (Peters et al., 2012; Abranches et al., 2018). Os estreptococos são considerados os micro-organismos colonizadores iniciais da cavidade bucal (Yumoto et al., 2019), no entanto, muitas outras espécies bacterianas e fúngicas se instalam com o decorrer do tempo. Entre essas, *Candida albicans* é a espécie fúngica mais frequente na cavidade bucal com alta capacidade de se aderir e colonizar as superfícies dos dentes e mucosas, formando uma agregação complexa com estreptococos e outras espécies bacterianas (Hwang et al., 2017; Veerapandian, VEDIYAPPAN, 2019; Salehi et al., 2020).

C. albicans é uma levedura comensal capaz de colonizar as superfícies de diferentes mucosas humanas em indivíduos saudáveis, entretanto pode tornar-se um patógeno oportunista, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, causando doenças que variam de candidoses mucosas a infecções sistêmicas (Tsui et al., 2016; Bartnicka et al., 2019). O desenvolvimento de candidose bucal também está associado ao uso de próteses dentárias e aparelhos ortodônticos, independentemente do *status* do sistema imunológico do hospedeiro. Esses aparelhos e dispositivos protéticos fornecem um ambiente propício para o crescimento de *C. albicans*, uma vez que recobrem uma grande área de tecidos da mucosa por longos períodos de tempo (Silva et al., 2019; Ghazal et al., 2019). Em geral, as células de levedura têm um alto potencial de aderência aos materiais, quase da mesma maneira que aos tecidos orais (Bürgers et al., 2010). A camada mais externa da parede celular de *Candida* é recoberta por polissacarídeos hidrofílicos, como manana ou galactomanana. Essas mananas funcionam como adesinas na superfície dos fungos e estão envolvidas não apenas na adesão à

célula hospedeira, mas também, na adsorção em superfícies bióticas (Ohshima et al., 2018).

Além dos mecanismos de aderência, a alta capacidade de *C. albicans* em se adaptar e transitar da forma comensal para patogênica está associado com outros fatores de virulência, como alterações morfológicas, formação de biofilme, produção de enzimas histolíticas e desenvolvimento de resistência à medicamentos (Vila et al., 2020).

Durante a infecção, *C. albicans* apresenta a capacidade de mudar a morfologia de leveduras para formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas), o que contribui para a invasão tecidual e formação de biofilmes. Os biofilmes de *C. albicans* são altamente estruturados e compostos por diferentes tipos morfológicos de células (leveduras, hifas e pseudo-hifas) embebidas em uma matriz extracelular (Guo et al., 2017; De Barros et al., 2020). McCall et al. (2019) demonstraram que cepas de *C. albicans* hiperfilamentosas apresentaram formação da biomassa do biofilme dez vezes maior em relação às células de leveduras, mostrando que a formação de hifas desempenha um papel fundamental no crescimento e virulência do biofilme.

O primeiro relatório científico documentado sobre um biofilme foi em 1683 em um artigo escrito por Antonie van Leeuwenhoek para a *Royal Society* de Londres, no qual esse pesquisador relatou a seguinte observação microscópica sobre o biofilme dentário: “O número dessas células animais no fermento dos dentes de um homem são tantos que acredito que excedem o número de homens em um reino” (Gulati, Nobile, 2016). Atualmente, sabe-se que essa complexidade microbiana observada nos biofilmes resulta em um aumento substancial da sua resistência aos agentes químicos e físicos, tornando-os muito difíceis de serem combatidos em contextos clínicos. Os biofilmes exibem maior resistência às várias classes de medicamentos e são capazes de suportar concentrações antifúngicas até 1000 vezes maiores do que aquelas que inibem as células em crescimento livre (planctônicas). A resistência do biofilme de *C. albicans* à terapia antifúngica parece ser multifatorial, com diversos mecanismos trabalhando de maneira coordenada nos vários estágios do crescimento do biofilme (Ksiezopolska, Gabaldón, 2018; Sanglard, 2019).

A formação de biofilmes requer uma série de etapas que dependem do tipo de micro-organismo envolvido: 1) adesão do micro-organismo à uma superfície; 2)

formação da camada basal de microcolônias, seguido pelo desenvolvimento de hifas e aumento na formação de matriz, o que leva ao estabelecimento de agregados em multicamadas; 3) maturação, quando há cobertura da superfície por numerosas microcolônias e presença de canais no biofilme; 4) dispersão, havendo liberação de células que poderão dar início a um novo ciclo de formação do biofilme (Tsui et al., 2016; Zarnowski et al., 2018).

Vários estudos demonstraram que a capacidade de *C. albicans* em formar biofilmes depende de alguns fatores, como a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), as características do tecido ou material de aderência, a disponibilidade de fontes de carbono, bem como a capacidade de interagir com outras espécies de micro-organismos (Cavalheiro, Teixeira, 2018; Zarnowski et al., 2018; Bartnicka et al., 2019; De Barros et al., 2020). Os genes e produção de metabólitos das cepas de *C. albicans* também são fatores que influenciam na formação de biofilmes (Rodríguez-Cerdeira et al., 2018). Com o desenvolvimento de novas tecnologias nos perfis de expressão gênica e manipulação genética de *C. albicans*, os mecanismos reguladores que governam o desenvolvimento do biofilme e a tolerância ou resistência aos medicamentos tem se tornado cada vez mais compreendidos (Ramage et al., 2002; Guo et al., 2017; Xu et al., 2017).

Diante desses avanços científicos, recentemente as pesquisas sobre tratamento de candidose têm se voltado para a presença de células persistentes nos biofilmes. As células persistentes são uma pequena subpopulação dentro dos biofilmes fúngicos que são altamente tolerantes às altas concentrações de antifúngicos, podendo assim contribuir para a resistência e recidivas das infecções fúngicas associadas à formação de biofilmes (Fisher et al., 2017; Wuyts et al., 2018). Wood et al. (2013) descrevem que as células persistentes dos biofilmes são aquelas que entram em estado dormente. Assim, as células persistentes não passam por crescimento e divisão celular, isso faz com que os medicamentos não consigam exercer seus efeitos, pois esses requerem que o alvo de ação celular esteja ativo. Esse estágio de dormência não causa resistência, já que não traz alterações genotípicas, e sim fenotípicas.

LaFleur et al. (2006) demonstraram que o tratamento com anfotericina B e clorexidina em doses microbicidas levaram a eliminação completa de *C. albicans* em populações planctônicas, entretanto em biofilmes houve a sobrevivência de células

persistentes. Além disso, foi verificado que essas células sobreviventes foram capazes de produzir um novo biofilme. Por outro lado, alguns estudos relataram que nem todos os biofilmes de *C. albicans* são capazes de formar células persistentes (Al-Dhaheri, Douglas, 2008; Denega et al., 2019). Sun et al. (2016) sugeriram que a formação de células persistentes tolerantes a antifúngicos estão intimamente relacionadas com a fase inicial de adesão à superfície, ou seja, a adesão à superfície é necessária para o surgimento e manutenção das células persistentes de *C. albicans* (Sun et al., 2016).

As lesões de candidose bucal são classificadas em quatro formas primárias com base na apresentação clínica: 1) pseudomembranosa, 2) eritematosa aguda, 3) eritematosa crônica e 4) hiperplásica (Williams et al., 2011; Singh et al., 2014; Sakaguchi, 2017). A candidose pseudomembranosa (forma 1) aparece como lesões brancas cremosas na mucosa bucal facilmente removidas pela raspagem. O exame histológico das pseudomembranas recuperadas revela a presença de células epiteliais descamadas, juntamente com leveduras e hifas de *Candida*. Tradicionalmente, essa infecção é considerada uma condição aguda que afeta frequentemente recém-nascidos, devido a presença de um sistema imunológico imaturo. Em indivíduos adultos, a candidose pseudomembranosa ocorre frequentemente quando há limitação nutricional, supressão imunológica ou doenças sistêmicas associadas (Kragelund et al., 2016; Sakaguchi, 2017). Além da candidose pseudomembranosa, outra forma de infecção por *Candida* é a candidose eritematosa aguda (forma 2). Essa forma de candidose bucal ocorre frequentemente após o tratamento com antibióticos de amplo espectro, que ao diminuir a população bacteriana residente, facilita o crescimento subsequente de *Candida* por aliviar as pressões competitivas. A infecção ocorre, frequentemente, como lesões avermelhadas no dorso da língua e palato. Pode ocorrer também a candidose eritematosa crônica (forma 3), que é caracterizada por lesões atróficas na mucosa subjacente de próteses dentárias (Lewis, Williams, 2017). Por fim, a candidíase hiperplásica (forma 4), também chamada de leucoplasia por *Candida*, pode aparecer em qualquer superfície da mucosa bucal como lesões brancas (homogêneas) ou nodulares. Ao contrário das lesões de candidose pseudomembranosa, as da candidose hiperplásica crônica não podem ser removidas por raspagem suave (Vila et al., 2020).

A candidose eritematosa crônica é muito comum em usuários de próteses, sendo geralmente assintomática (Martins, Gontijo, 2017; Rodrigues et al., 2019). O uso de prótese é considerado um dos principais fatores predisponentes para a candidose bucal, principalmente nos casos em que a prótese não é adequadamente higienizada ou usada de modo contínuo sem remoção durante o sono. Nessas condições, a área estagnada da base da prótese proporciona um ambiente ideal para o crescimento de *Candida*, que se adere facilmente à resina acrílica (Lira, Torres, 2018). Além disso, o fluxo salivar limitado no espaço entre a prótese e a mucosa prejudica a ação mecânica e antimicrobiana da saliva para remoção das células fúngicas. Nas situações em que há uma prótese mal ajustada, a irritação por atrito pode danificar a barreira mucosa protetora, facilitando a invasão de *C. albicans* no tecido e, conseqüentemente, promovendo a infecção (Ribeiro et al., 2019).

Atualmente, existem 3 classes de fármacos antifúngicos usados como monoterapia para infecções por *Candida*: azóis, polienos e equinocandinas (Perfect, 2018; Costa-de-Oliveira, Rodrigues, 2020). Os azóis (fluconazol, voriconazol, cetoconazol e itraconazol) inibem a enzima 14 α -lanosterol desmetilase, interrompendo a síntese de ergosterol e, conseqüentemente, resultando na alteração das funções da membrana celular e inibição do crescimento de *C. albicans*. Os mecanismos relacionados à resistência de *C. albicans* aos antifúngicos azóis incluem mutações que resultam em aumento da expressão de bombas de efluxo e ou alterações no alvo do fármaco (Arendrup, Patterson, 2017; Zhao et al., 2018; Pristov, Ghannoum, 2019).

Os polienos (anfotericina B e nistatina) inibem as espécies de *Candida* por meio da ruptura do ergosterol e formação de poros que desestruturam a membrana citoplasmática. Presume-se que a resistência a esta classe de antifúngico envolva a diminuição do conteúdo total de ergosterol da célula, substituição de alguns ou todos os esteróis de ligação de polieno, e reorientação ou mascaramento de ergosterol existente, resultando na redução da afinidade de ligação do fármaco às moléculas de ergosterol fúngica (Taff et al., 2013; Hokken et al., 2019; Lee et al., 2020). Embora o grau de resistência de *Candida* aos polienos seja menor que dos azóis, a janela terapêutica da anfotericina B é mais estreita. As doses de anfotericina B necessárias para reduzir significativamente as células de *C. albicans* possuem toxicidade, exibindo principalmente efeitos nefrotóxicos. A nefrotoxicidade durante a

terapia com anfotericina B ocorre por meio de dois mecanismos. O primeiro envolve a constrição direta das arteríolas renais, resultando em redução da perfusão renal e queda na taxa de filtração glomerular. Já o segundo mecanismo está relacionado aos danos diretos às membranas tubulares distais do rim, provavelmente por meio da ligação ao colesterol e formação de poros, reduzindo a capacidade da membrana tubular de reabsorver eletrólitos, o que resulta em hipocalcemia e hipomagnesemia (Patel et al., 2011; Taff et al., 2013; Adler-Moore et al., 2019).

As equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) são inibidores da β -1,3 glucana sintase, responsável pela produção do glucano da parede celular, resultando em instabilidade osmótica e lise da célula fúngica. A resistência às equinocandinas tem sido associada às mutações pontuais adquiridas por *C. albicans* (Pais et al., 2019; Pristov, Ghannoum, 2019) e à uma resposta compensatória com aumento da produção de quitina na parede celular (Ghannoum, 2019).

O aumento crescente da resistência fúngica aos fármacos convencionais traz a necessidade de novas abordagens terapêuticas para o controle das infecções por *Candida*, causadas principalmente por biofilmes, como as candidoses bucais. A terapia fotodinâmica (TFD) antimicrobiana vem se demonstrando um método eficaz para eliminar micro-organismos, podendo ser aplicada localmente, o que evita efeitos colaterais adversos. Além disso, a TFD apresenta como vantagem a baixa probabilidade de indução de resistência microbiana por apresentar múltiplos alvos de ação (Pereira Gonzales, Maisch, 2012; Hamblin, 2016; Stájer et al., 2020).

A TFD é um método emergente de tratamento não invasivo, envolvendo um fotossensibilizador (FS), luz em comprimento de onda específico e presença de oxigênio (Hamblin, Hasan, 2004). O FS ativado pela luz, em comprimento de onda adequado, pode reagir com o oxigênio de duas formas: transferência de elétrons gerando radicais livres (mecanismo Tipo I) ou transferência de energia com geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (mecanismo Tipo II). Ambas as reações levam a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) que são tóxicas e promovem danos a vários componentes vitais do micro-organismo, como DNA, proteínas e lipídios, resultando em morte celular sem prejuízos aos tecidos do hospedeiro (Alves et al., 2014; Taraszkiewicz et al., 2015; Ozturk et al., 2020).

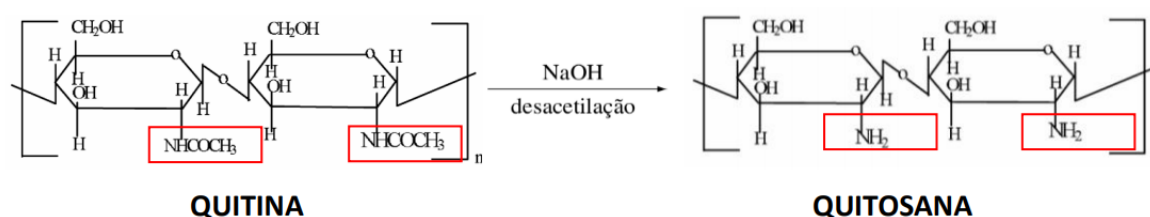
Os efeitos antimicrobianos da TFD sobre *C. albicans* tem sido comprovado por alguns autores, mesmo em cepas resistentes aos antifúngicos azóis (Costa et al., 2012; Carmello et al., 2016; Carvalho et al., 2018; Da Collina et al., 2018; De Carvalho et al., 2019). O Azul de Metileno (AM) é um corante fenotiazínico catiônico, bastante utilizado como fotossensibilizador na TFD antimicrobiana. Devido à sua carga positiva, pode penetrar de forma eficiente na célula fúngica, promovendo a ação da TFD (Giroldo et al., 2007; Souza et al., 2009; Fumes et al., 2018). Kato et al. (2013) demonstraram que a aplicação de AM junto à TFD resultou na inibição dos fatores de virulência e redução da patogenicidade *in vivo* em *C. albicans* (Kato et al., 2013). De Carvalho et al. (2019) verificaram que a TFD na presença de AM levou à inibição da colonização e formação de biofilmes de *C. albicans*, com redução do metabolismo celular e da quantidade de células fúngicas. Alguns autores relataram que a eficácia da TFD em reduzir a formação de biofilmes por *C. albicans* pode estar relacionada à incapacidade das leveduras sobreviventes em formar tubo germinativo após essa terapia (Rossoni et al., 2014; Brancini et al., 2016; Cernáková et al., 2017).

Durante a TFD, alguns parâmetros devem ser considerados a fim de se obter resultados promissores, como tempo de pré-irradiação, fonte de luz, tempo de exposição à luz e a concentração do fotossensibilizador. Da Collina et al. (2018) demonstraram a importância de se considerar, também, o parâmetro de agregação do AM e sua eficácia contra *C. albicans*. Moléculas de corantes catiônicos, como o AM, exibem um comportamento característico em função de sua concentração em solução. Elas podem se unir formando dímeros moleculares, ou mesmo trímeros e agregados maiores. Os monômeros de AM são mais eficazes para inativar *C. albicans* do que os dímeros (Moreira et al., 2017). Portanto, conhecer os diferentes mecanismos fotoquímicos considerando a presença de monômeros e dímeros do FS é um fator importante para a eficiência da absorção da luz e, consequentemente, maior produção de oxigênio singlete e radicais livres (Junqueira et al., 2002; Da Collina et al., 2018; Vara et al., 2019).

Ainda buscando aumentar a eficácia da TFD, alguns estudos têm investigado possíveis agentes, que combinados ao fotossensibilizador, possam potencializar os efeitos fotodinâmicos dessa terapia. Entre esses agentes, destaca-se a quitosana, um polissacarídeo natural composto por β -(1-4) D-glucosamina ligada a resíduos de

N-acetil-D-glucosamina (Chen et al., 2012; Camacho-Alonso et al., 2016). É a forma desacetilada da quitina (Figura 1), o segundo biopolímero natural mais abundante depois da celulose, devido à sua prevalência nos exoesqueletos de artrópodes e na parede celular da maioria dos fungos (Galván et al., 2013; El Knidri et al., 2018; Peng et al., 2019). Pelas suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, a quitosana tem sido investigada quanto à sua atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias e vírus (Rabea et al., 2003; Zhang et al., 2010; Upadhyaya et al., 2013; Kim et al., 2019).

Figura 1-Reação de desacetilação da quitina



Fonte: Rolim et al., 2018.

Os principais mecanismos atribuídos à atividade antimicrobiana da QT têm sido relacionados à: 1) capacidade de quelação de metais que pode desestabilizar a membrana externa ou parede celular dos micro-organismos; 2) interações eletrostáticas entre resíduos negativos da superfície celular e os grupos amino-protonados que levam à permeabilidade da parede celular e perturbação da membrana plasmática do patógeno; 3) interação entre o DNA microbiano e a quitosana internalizada que podem interferir na expressão gênica do micro-organismo (Galván et al., 2013; Mansilla et al., 2013; Verlee et al., 2017). O grau de desacetilação e o peso molecular da quitosana também são fatores cruciais para a atividade antifúngica. Em geral, a atividade antifúngica aumenta quando o grau de desacetilação é maior e o peso molecular é menor. Essa característica foi demonstrada em amostras de quitosana com diferentes pesos e grau de desacetilação testados contra *C. albicans* (Kulikov et al., 2014; Sahariah, Másson, 2017; Namangkalakul et al., 2019).

Recentemente, foi relatado que a TFD com AM combinada à quitosana apresentou efeitos sinérgicos contra *Helicobacter pylori* (Kim et al., 2019). Tem sido postulado que a quitosana pode alterar a integridade da membrana celular microbiana, o que pode facilitar a penetração do FS, resultando em maior efeito antimicrobiano da TFD. A quitosana apresenta caráter catiônico originário de seus diversos grupos aminos, presentes na sua molécula, que provavelmente se ligam aos grupos aniônicos das células microbianas resultando na aglutinação dessas células e inibição do crescimento (Prabaharan, 2008; Calixto et al., 2019). Considerando as características químicas da quitosana, alguns autores desenvolveram sistemas de administração de medicamentos com nanopartículas de quitosana para incorporação de FS, a fim de aumentar a eficácia da TFD em doenças causadas por infecções fúngicas, bacterianas e tumorais (Shrestha, Kishen, 2012; Duse et al., 2017; Mohammadreza, 2019; Pandya et al., 2020).

Baseado nesse contexto, surgiu o interesse em investigar o efeito da associação da quitosana à TFD sobre culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes de *C. albicans*, buscando-se um possível efeito sinérgico que possa beneficiar as aplicações clínicas da TFD na área médica-odontológica.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a quitosana como um possível potencializador da Terapia Fotodinâmica (TFD), mediada pelo fotossensibilizador Azul de Metileno, para o controle de *Candida albicans*.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) determinar os efeitos da associação da quitosana à TFD sobre células de *C. albicans* em culturas planctônicas;
- b) avaliar a atividade inibitória da quitosana associada à TFD sobre biofilmes de *C. albicans*;
- c) verificar os efeitos da associação da quitosana à TFD sobre células persistentes de *C. albicans*, após tratamento com altas concentrações de fluconazol;
- d) avaliar o efeito da quitosana sobre a capacidade das células de *C. albicans* em absorver o fotossensibilizador azul de metileno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *C. albicans*

No presente estudo, foi utilizada uma cepa padrão de *C. albicans* 18804 e uma cepa clínica isolada de candidose orofaríngea (70) resistente ao fluconazol. Ambas as cepas são mantidas em freezer a -80°C no laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/Unesp. Para ativação, as cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud por 48 h a 37°C.

3.2 Fotossensibilizador e fonte de luz

Para a realização da fotossensibilização *in vitro* foi seguida a metodologia descrita por Freire et al. (2016). O fotossensibilizador Azul de Metileno foi preparado nas concentrações de 300 e 600 µM por meio da dissolução do pó em PBS, e posteriormente, esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm. A fonte de luz (L) utilizada foi o equipamento Irrad-Led (Biopdi - São Carlos, SP, Brasil) no comprimento de onda de 660 nm (vermelho visível), densidade de energia de 30 J/cm², densidade de potência de 42,8 mW/cm² e tempo de 714 segundos.

3.3 Preparo da solução de quitosana

A quitosana utilizada nesse trabalho foi obtida a partir da desacetilação da quitina extraída de carapaças de camarão e foi fornecida pela Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETECH) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A solução de quitosana foi preparada de acordo com estudos de Costa et al. (2006), no qual 1 g de quitosana em flocos (grau de desacetilação 86,5%) foi dissolvido em 200 mL de solução de ácido acético a 1% e deixado sob agitação em agitador magnético por 2 horas, resultando na concentração de 5 mg/mL. O pH da solução foi ajustado à 6,5 (Illum, 1998; Hyppólito, 2014), utilizando-se NaOH 1 Molar em constante agitação. Posteriormente, a solução de quitosana foi esterilizada em autoclave a 110°C por 10 minutos.

3.4 Grupos experimentais

Os estudos em culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes foram divididos nos seguintes grupos experimentais: TFD com Azul de Metileno, Quitosana e Luz (AM+QT+L+), Azul de Metileno e Quitosana sem Luz (AM+QT+L-), Quitosana e Luz (QT+L+), Quitosana sem Luz (QT+L-), TFD com Azul de Metileno e Luz (AM+L+), Azul de Metileno sem Luz (AM+L-), solução fisiológica e Luz (F-L+) e apenas Solução Fisiológica (F-L-). Em cada grupo experimental foram incluídas 5 amostras (n = 5).

3.5 Terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de *C. albicans*

3.5.1 Preparo da suspensão de *C. albicans*

Para cada cepa de *Candida* foi preparada suspensão padronizada contendo 10^7 células/mL. As cepas de *Candida* foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, India) por 48 h a 37°C. A seguir, cada cepa foi semeada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Himedia, Mumbai, India) acrescido de 100 µM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) e incubada a 37°C por 24 h. O crescimento foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). Esse

procedimento foi repetido duas vezes. A contagem do número de células em suspensão foi determinada em Câmara de Neubauer espelhada (Laboroptik GmbH, Alemanha).

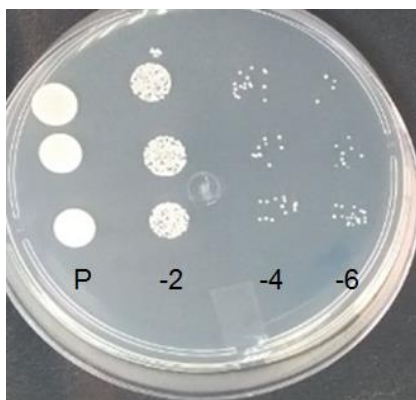
3.5.2 Fotossensibilização das culturas planctônicas de *C. albicans*

A fotossensibilização sobre as culturas planctônicas de *C. albicans* foi realizada em placas de 96 poços. Uma alíquota de 100 μ L da suspensão de *C. albicans*, previamente padronizada, foi adicionada em cada poço da placa. De acordo com os grupos experimentais descritos acima, foi adicionado 100 μ L do fotossensibilizador ou PBS. Nos grupos que havia a associação do AM com QT foram colocados 50 μ L de cada, sempre resultando em concentração de 300 μ M de AM em cada poço. As placas foram envolvidas com papel alumínio para evitar a irradiação de luz do ambiente e foram levadas para o agitador orbital (Solab Piracicaba, Brasil) durante 15 min (tempo de pré-irradiação). Então, as placas foram levadas para irradiação nos parâmetros descritos acima.

3.5.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)

Após a irradiação, foram preparadas diluições seriadas e 10 μ L de cada diluição foram semeados 3 vezes em pontos diferentes da placa (técnica da gota) (Figura 2). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Figura 2 - Imagem ilustrativa da técnica da gota para contagem de UFC/mL



Legenda: Placa de Petri contendo ágar Sabouraud, contendo gotas com as diluições para contagem de UFC/mL. Primeira coluna é puro, segunda é a diluição -2, terceira é a diluição -4 e a ultima é a diluição -6.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Terapia fotodinâmica sobre biofilmes de *C. albicans*

3.6.1 Formação do biofilme de *C. albicans*

O biofilme foi formado em fundo de placas de 96 poços. Para isso, em cada poço foi adicionado uma alíquota de 200 μ L da suspensão de *Candida* padronizada em 10^7 células/mL conforme descrito no item 3.5.1. As placas foram incubadas por 1 h e 30 min em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) para aderência inicial. Após esse período, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, e em seguida, adicionado 200 μ L de caldo YNB. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. O conteúdo dos poços foi aspirado novamente e os poços lavados duas vezes com PBS, e então, foram acrescentados 200 μ L de caldo YNB. As placas foram incubadas por mais 24 h (37°C), totalizando 48 h de formação de biofilme.

3.6.2 Fotossensibilização do biofilme de *C. albicans*

Após as 48 h de formação do biofilme no fundo dos poços, o caldo foi aspirado e os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de PBS. Então, foi adicionado PBS, AM, QT ou AM+QT de acordo com cada grupo experimental. As placas foram envolvidas em papel alumínio para evitar a irradiação da luz do ambiente e colocadas em agitador orbital por 15 min (tempo de pré-irradiação). Em seguida, os grupos com luz foram irradiados seguindo os protocolos descritos anteriormente.

3.6.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)

Após a irradiação, foi feita o desprendimento do biofilme utilizando-se um homogeneizador ultrassônico com potência de 7 W por 30 s. Depois foram preparadas diluições seriadas e uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi semeada 3 vezes em pontos diferentes da placa (técnica da gota). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.7 Terapia fotodinâmica sobre células persistentes de *C. albicans*

A metodologia para indução de células persistentes foi realizada de acordo com Rossoni et al. (2020) com algumas modificações. Para indução das células persistentes, primeiramente foi preparada uma cultura estacionária de 72 h de *C. albicans* da cepa ATCC, em 25 mL de caldo YPD (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Após o período de incubação, 1 mL do crescimento foi colocado em microtubos de 1,5 mL, centrifugado a 13.000 x g por 2 min e o sedimento lavado por duas vezes com PBS. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 1 mL em meio RPMI 1640 (L-glutamina e 0,165 M de MOPS) contendo diferentes

concentrações dos antifúngicos fluconazol (100X, 150X e 200X da Concentração Inibitória Mínima pelo método de diluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI).

Posteriormente, os conteúdos dos microtubos com os diferentes tratamentos foram adicionados aos poços de placas de 96 poços e incubados sob agitação de 100 rpm a 37°C por 48 h. Após o período de incubação, 100 µL de cada preparação foi aspirado e transferido para uma placa de 96 poços, onde o conteúdo foi submetido à TFD nos mesmos parâmetros dos ensaios anteriores. Após a irradiação, a cultura com as células persistentes irradiadas foi diluída serialmente em PBS e plaqueada em ágar YPD para a quantificação da UFC/mL. O número de células persistentes ao fluconazol que sobreviveram à TFD foi quantificado em comparação com o grupo controle (sem TFD contendo as células persistentes ao tratamento com fluconazol). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 Análise da absorção do fotossensibilizador pelas células de *C. albicans*

Essa análise foi realizada seguindo a metodologia proposta por Souza et al. (2020). As cepas de *C. albicans* foram cultivadas em caldo YNB por 24h. As células foram centrifugadas em 5000 xg durante 10 min e lavadas com água destilada. A densidade óptica das culturas foram ajustadas para 10^7 células/mL. Após a padronização do número de células de *Candida*, 1 mL de cada suspensão foi colocado em tubo Falcon contendo 1 mL de fotossensibilizador AM, água destilada ou quitosana, de acordo com os grupos experimentais. Os tubos foram incubados a 37°C durante 15 min em incubadora orbital a 120 rpm. Após esse período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada e lisadas por tratamento com 1 mL de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) a 2% durante 16 h. A intensidade de absorbância da solução do sobrenadante após a centrifugação (5000 xg) durante 10 min foi registrada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil).

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos na contagem de UFC/mL foram convertidos para Log_{10} . Os resultados de todos os ensaios experimentais foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0, com nível de significância de 5%.

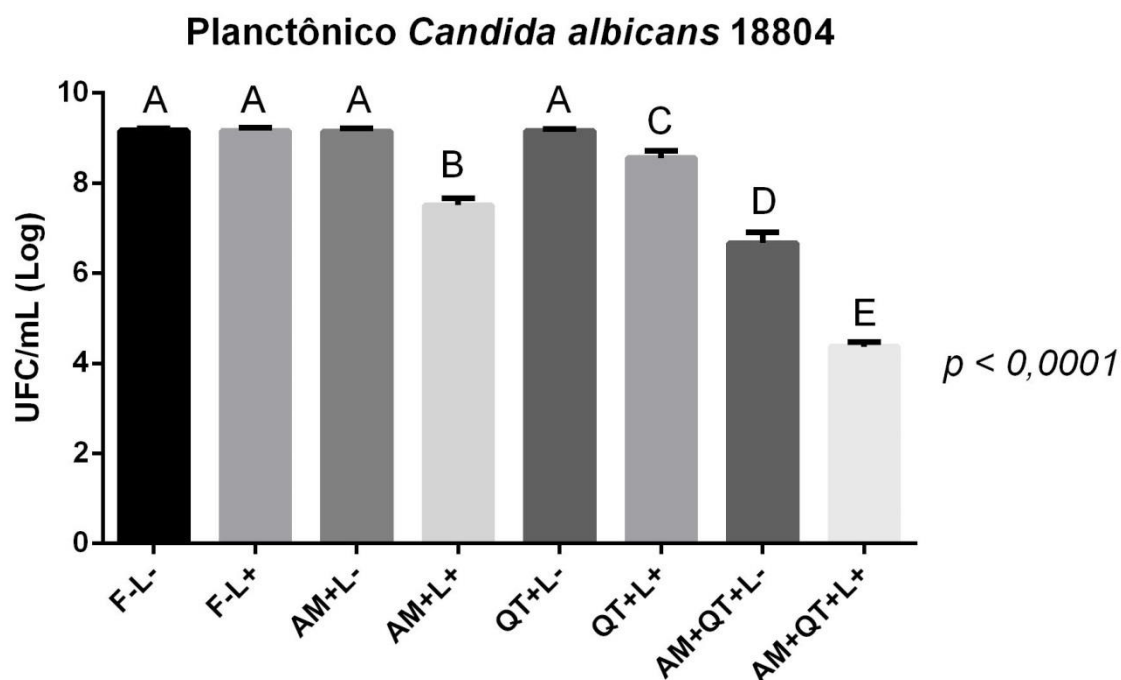
4 RESULTADO

4.1 Ação da terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de *C. albicans*

Como resultado dos ensaios da TFD sobre culturas planctônicas da cepa ATCC 18804 de *C. albicans*, foi possível observar que os grupos controles F-L- e F-L+ tiveram um crescimento médio de 9,2 log (UFC/mL), assim como os grupos AM+L- e QT+L-. Foram encontradas reduções de 2,4 log no grupo tratado com quitosana e AM sem irradiação (AM+QT+L-) quando comparados ao grupo controle F-L-. Esses dados indicam uma ação antimicrobiana da quitosana associada ao AM mesmo na ausência da TFD. Em relação aos grupos submetidos à TFD, verificou-se inibição de 1,6 log no grupo AM+L+ e 4,7 log para o grupo de quitosana associada à PDT (AM+QT+L+) em relação ao grupo F-L-. Interessantemente, esses resultados comprovam uma ação potencializadora significativa da quitosana na TDF. Se compararmos os grupos AM+L+ com o grupo AM+QT+L+ é possível observar que a associação da quitosana potencializou a atividade da TFD em 3,1 log (UFC/mL) (Figura 3).

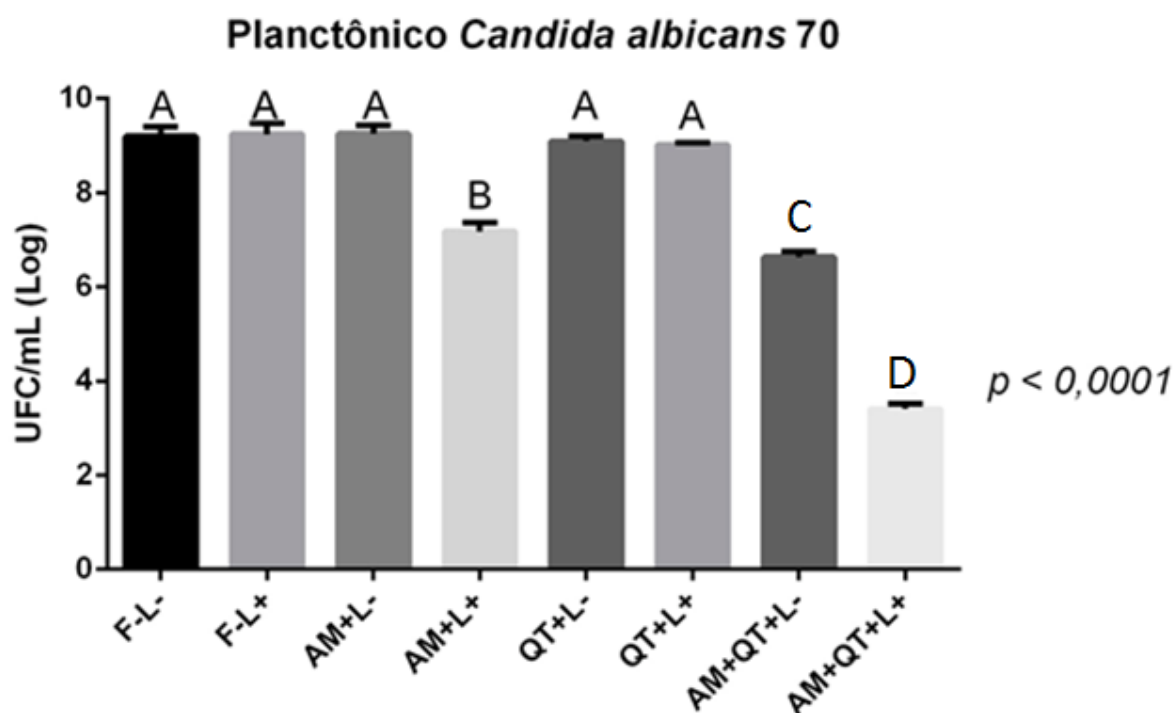
Em relação ao estudo com a cepa de *C. albicans* 70, verificou-se que essa cepa clínica apresentou um perfil de susceptibilidade aos tratamentos de forma semelhante à cepa padrão de *C. albicans*. A TFD com AM (AM+L+) foi capaz de inibir 2,0 log de UFC/mL de *C. albicans* em relação ao grupo controle (F-L-). Entretanto, quando a Quitosana foi associada à TFD, foram alcançadas reduções microbianas de até 5,7 log (Figura 4). Assim, esses dados sugerem que a ação potencializadora da quitosana na TFD encontrada na cepa padrão também se estende para cepas clínicas de *C. albicans*.

Figura 3 - Dados de UFC/mL de *C. albicans* (cepa ATCC 18804) obtidos no teste em culturas planctônicas



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Quitosana na ausência de luz (QT+L-); Grupo Quitosana com luz (QT+L+); Grupo Azul de Metileno mais Quitosana na ausência de luz (AM+QT+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno mais Quitosana (AM+QT+L+).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Dados de UFC/mL de *C. albicans* cepa 70 (clínica) obtidos no teste em culturas planctônicas



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Quitosana na ausência de luz (QT+L-); Grupo Quitosana com luz (QT+L+); Grupo Azul de Metileno mais Quitosana na ausência de luz (AM+QT+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno mais Quitosana (AM+QT+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ação da terapia fotodinâmica em biofilmes de *C. albicans*

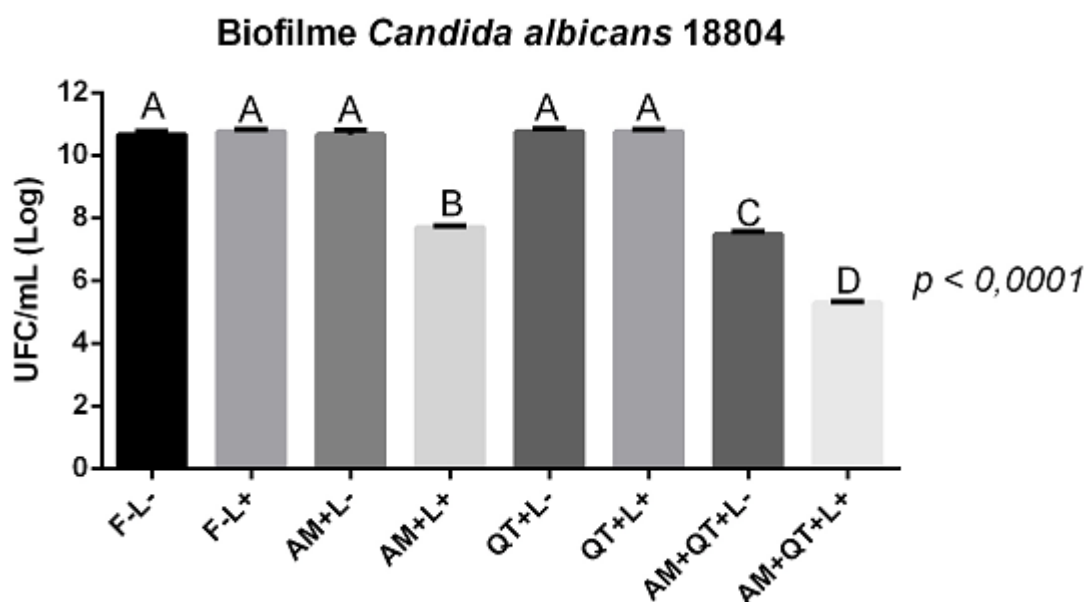
Os biofilmes da cepa de *C. albicans* ATCC apresentaram crescimento médio de 10,7 log (UFC/mL) nos grupos controles (F-L- e F-L+), e também, nos grupos AM+L-, QT+L- e QT+L+. A TFD com Azul de Metileno (AM+L+) resultou em uma inibição significativa de 2,9 log na contagem de UFC/mL quando comparado aos grupos controles. A associação de Azul de Metileno e Quitosana na ausência da irradiação (AM+QT+L-) também levou a uma inibição de 3,1 log de *C. albicans*. Entretanto, essas reduções fúngicas foram bem mais significativas (5,3 log de UFC/mL) quando à quitosana foi associada à TFD (AM+QT+L+) (Figura 5).

Com relação ao tratamento dos biofilmes formados pela cepa clínica de *C. albicans*, os grupos controles (F-L- e F-L+) apresentaram crescimento médio de 10,6

log, assim como o grupo AM+L-. A TFD com AM (AM+L+) apresentou efeito inibitório de 2,8 log em relação aos grupos controles. Os grupos com presença de Quitosana (QT+L- e QT+L+) apresentaram efeito inibitório de 0,8 e 0,9 log, respectivamente. Novamente, foi observado efeito inibitório significativamente maior na associação de AM com Quitosana, sendo essa inibição fúngica de 3,6 log na ausência de TFD (AM+QT+L-) e 5 log na presença da TFD (AM+QT+L+) (Figura 6).

Esses resultados sugerem que a quitosana tem capacidade de potencializar os efeitos da TFD sobre cepas padrão e clínicas de *C. albicans*, em ambos os estágios de crescimento planctônico e biofilme.

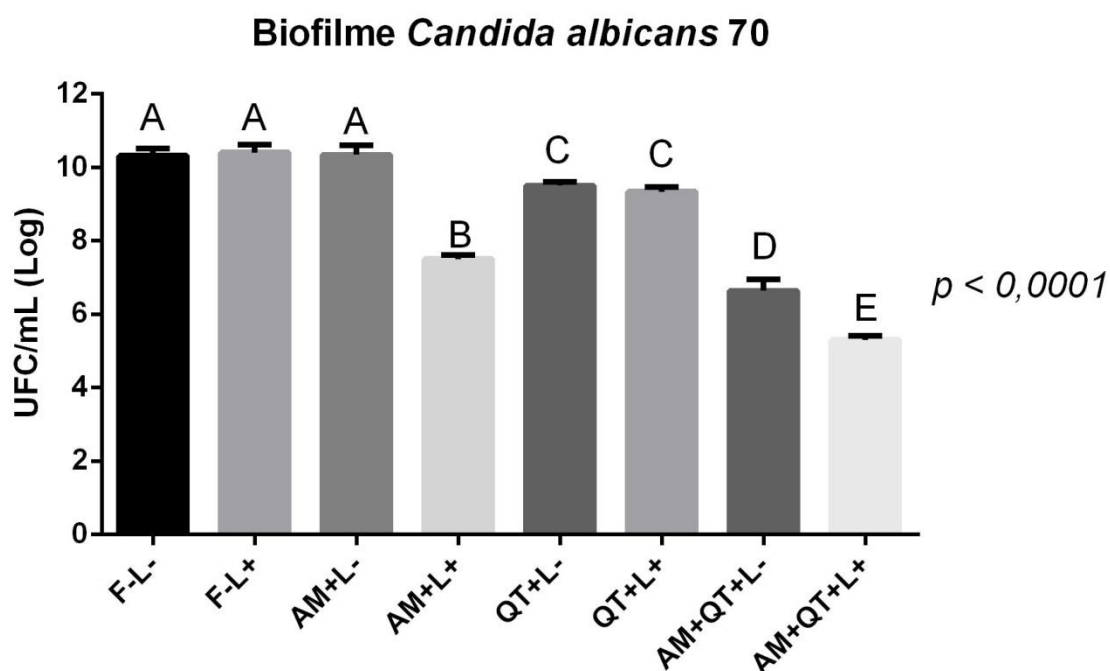
Figura 5 - Dados de UFC/mL de *C. albicans* 18804 (ATCC) obtidos nos testes em biofilmes



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Quitosana na ausência de luz (QT+L-); Grupo Quitosana com Luz (QT+L+); Grupo Azul de Metileno mais Quitosana na ausência de luz (AM+QT+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno mais Quitosana (AM+QT+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Dados de UFC/mL da cepa clínica de *C. albicans* obtidos nos testes em biofilmes



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Quitosana na ausência de luz (QT+L-); Grupo Quitosana com luz (QT+L+); Grupo Azul de Metileno mais Quitosana na ausência de luz (AM+QT+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno mais Quitosana (AM+QT+L+).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Ação da terapia fotodinâmica em células persistentes de *C. albicans*

No estudo de células persistentes de *C. albicans*, foram encontradas ação inibitória microbiana da TFD (AM+L+), e principalmente da TFD associada a quitosana (AM+QT+L+) em relação aos grupos não tratados com TFD.

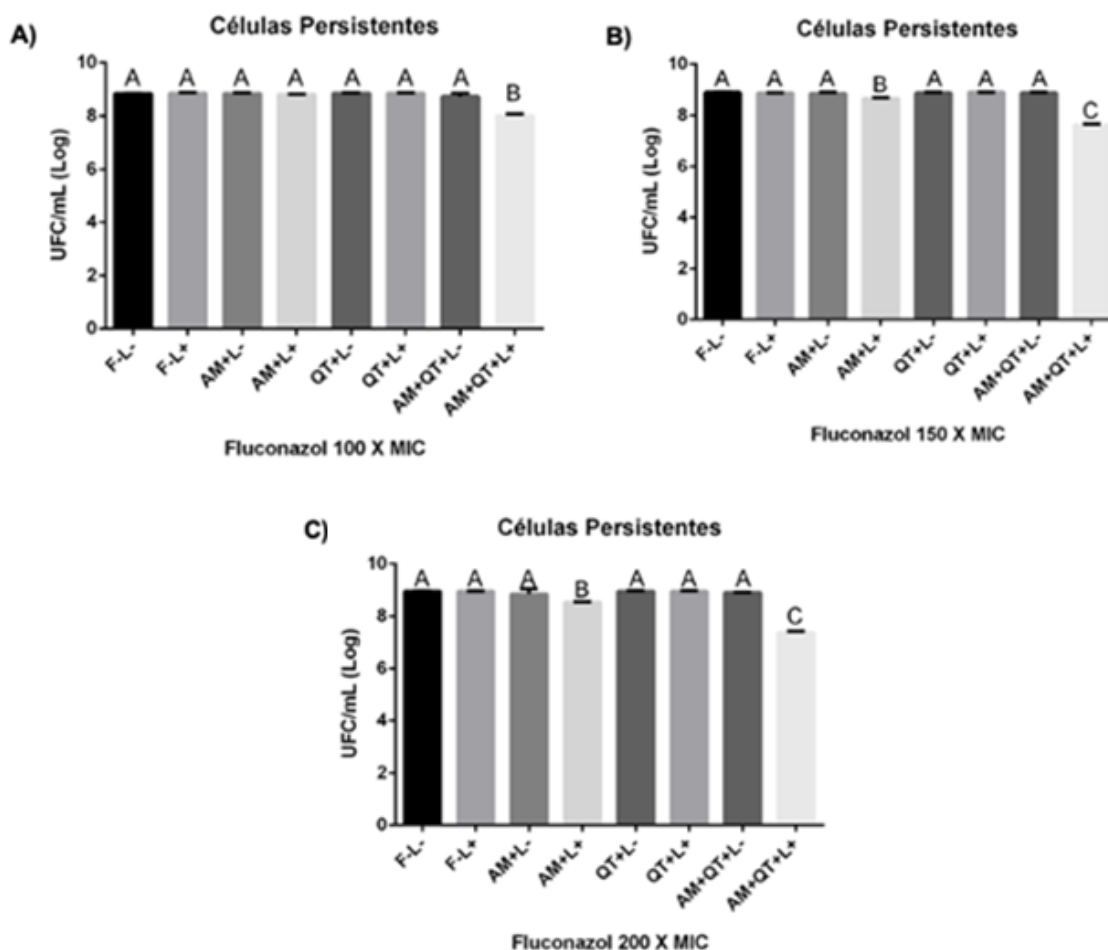
A TFD (AM+L+) foi capaz de reduzir 0,3 log das células persistentes a 150X MIC do fluconazol e 0,5 log das células persistentes a 200X MIC do fluconazol em relação ao grupo controle F-L-. Entretanto, a TFD não foi capaz de inibir as células de *Candida* persistentes a 100X MIC do fluconazol. No estudo da TFD associada a quitosana (AM+QT+L+), foram observadas reduções significativas em relação aos demais grupos estudados nas células de *C. albicans* persistentes ao fluconazol em todas as concentrações testadas (100X, 150X ou 200X). Essas reduções

microbianas alcançadas pela TFD e quitosana foram de, aproximadamente, 0,8 log para as células persistentes a 100X MIC do fluconazol (Figura 7A); 1,3 log para as células persistentes a 150X MIC do fluconazol (Figura 7B) e 1,5 log para as células persistentes de *C. albicans* a 200X MIC do fluconazol (Figura 7C).

Esses resultados demonstraram que a quitosana, além de potencializar a ação da TFD em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*, também foi capaz de potencializar os efeitos da TFD em células de *Candida* persistentes ao fluconazol. Entretanto, as células persistentes foram menos susceptíveis à TFD do que as culturas planctônicas e biofilmes.

Os dados indicaram, também, que os tratamentos com TFD (TFD ou TFD associada a QT) apresentaram maior efeito antifúngico sobre as células de *C. albicans* persistentes às concentrações mais elevadas de fluconazol. Ou seja, as células de *C. albicans* que tiveram contato com maiores concentrações de fluconazol foram mais sensíveis a ação da TFD.

Figura 7 - Dados de UFC/mL de *C. albicans* 18804 (ATCC) obtidos nos testes sobre células persistentes após tratamento com (a) fluconazol 100 X MIC; (b) fluconazol 150 X MIC; e (c) fluconazol 200 X MIC



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo com presença de luz (F-L+); Grupo Azul de Metileno na ausência de luz (AM+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno (AM+L+); Grupo Quitosana na ausência de luz (QT+L-); Grupo Quitosana com luz (QT+L+); Grupo Azul de Metileno mais Quitosana na ausência de luz (AM+QT+L-); Grupo TFD com Azul de Metileno mais Quitosana (AM+QT+L+).

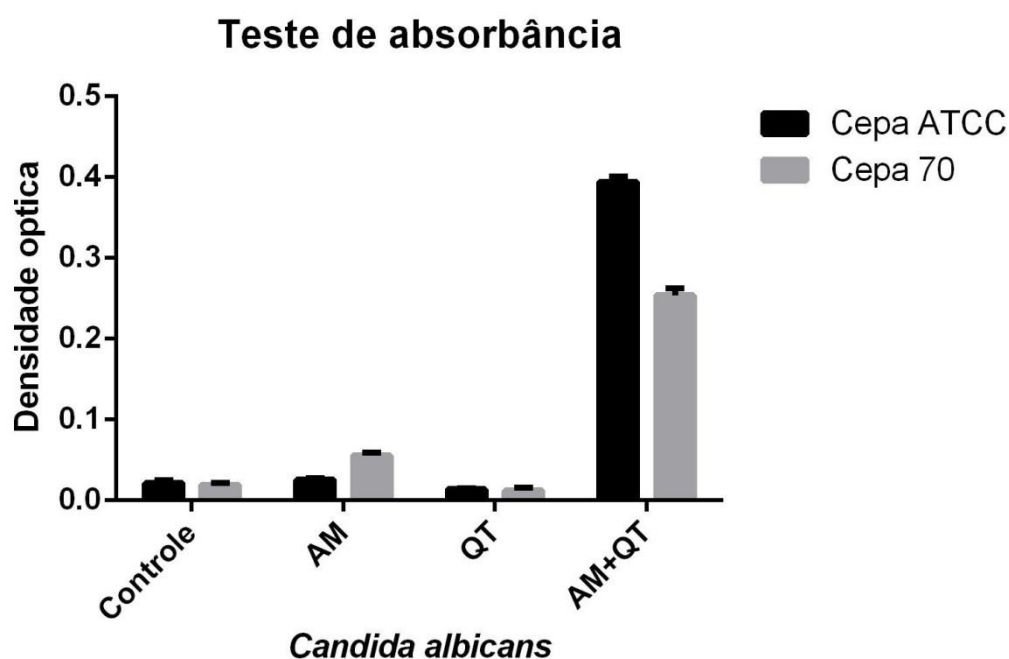
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise da absorbância do fotossensibilizador pelas células de *C. albicans*

Os resultados demonstraram que a Quitosana foi capaz de potencializar a penetração do AM nas células de *C. albicans*, tanto da cepa ATCC, como da cepa clínica (Figura 8). As células de *C. albicans* tratadas apenas com azul de metileno

(AM) exibiram DO médias de aproximadamente 0,024 e 0,058, respectivamente para a cepa ATCC e cepa 70. Entretanto, quando a quitosana foi associada ao AM (AM+QT), a DO média obtida foi superior ao grupo controle com valores aproximados de 0,399 para a cepa ATCC e 0,248 para a cepa 70. Esses dados sugeriram que o efeito potencializador da quitosana na TFD pode estar associado com a ação da quitosana em facilitar a penetração do fotossensibilizador nas células de *C. albicans*.

Figura 8 - Valores da Densidade Óptica obtidos no teste de absorção do fotossensibilizador azul de metileno pelas células de *C. albicans* (Cepas ATCC e 70)



Legenda: Grupo controle (água); Azul de Metileno (AM); Quitosana (QT); Azul de Metileno mais Quitosana (AM+QT).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Candidose é a infecção fúngica mais comumente encontrada na cavidade bucal, sendo de grande interesse na odontologia (Tsui et al., 2016; Bartnicka et al., 2019). Recentemente, a terapia fotodinâmica (TFD) tornou-se uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de infecções fúngicas orais (Carmello et al., 2019; Warrier et al., 2021), mostrando eficácia mesmo contra cepas de *Candida* resistentes à antifúngicos (Chibebe Junior et al., 2013; Daliri et al., 2019; Alves et al., 2019). A maior parte dos estudos de TFD para tratamento da candidose foi realizada empregando-se o fotossensibilizador azul de metileno, um corante fenotiazínico catiônico aprovado para uso clínico no Brasil (Giroldo et al., 2007; Souza et al., 2009; Fumes et al., 2018).

Buscando aumentar a eficácia do azul de metileno como fotossensibilizador na TFD, alguns possíveis agentes potencializadores tem sido investigados, como a quitosana. A quitosana é um polissacarídeo natural de caráter catiônico, composto por β -(1-4) D-glucosamina ligada a resíduos de N-acetil-D-glucosamina (Chen et al., 2012; Camacho-Alonso et al., 2016). É a forma desacetilada da quitina, o segundo biopolímero natural extraído, principalmente, dos exoesqueletos de artrópodes (Galván et al., 2013; El Knidri et al., 2018; Peng et al., 2019). Assim, o presente estudo avaliou a eficácia da terapia fotodinâmica, mediada por azul de metileno (AM), em associação com a quitosana (QT) para controle de *C. albicans*, analisando seus efeitos em culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes ao fluconazol.

Os resultados obtidos no estudo em culturas planctônicas demonstraram que a TFD causou reduções significativas no número de células viáveis de *C. albicans* em relação ao grupo controle, sendo esses efeitos antimicrobianos potencializados quando a TFD foi associada à quitosana. Na cepa padrão, o grupo controle teve um crescimento de 9,2 log de UFC/mL. Após o tratamento com TFD houve uma redução de 1,6 log no grupo com AM (AM+L+) e 4,7 log para o grupo de QT associada à TFD (AM+QT+L+). Em relação à cepa clínica os resultados foram semelhantes aos obtidos com a cepa padrão.

Kim et al. (2019) também estudaram a ação da QT associada à TFD com AM em culturas planctônicas sobre uma cepa padrão de *Helicobacter pylori*. Verificaram

que o pré-tratamento com quitosana em uma concentração abaixo de 0,05% antes da TFD com AM (em concentração inferior a 0,02%) aumentou o efeito fotodinâmico antimicrobiano em *H. pylori*. Entretanto, Camacho-Alonso et al. (2016) avaliaram o efeito da quitosana mais TFD em *C. albicans in vivo* e concluíram que a adição de quitosana ao azul de metileno não aumentou os efeitos antifúngicos da TFD. Seus resultados foram diferentes de nossos achados, possivelmente, pelo fato desses autores terem realizado um estudo *in vivo* e utilizarem diferentes dosagens de AM e QT. No estudo de Camacho-Alonso et al. (2016) foram avaliados 7 grupos de animais com candidose bucal: grupo controle; grupo tratado com nistatina; grupo TFD; grupo QT 1,5 mg/mL; grupo QT 3,0 mg/mL; grupo TFD + QT 1,5 mg/mL e grupo TFD + QT 3,0 mg/mL. A concentração de AM aplicada foi 450 µM em todos os grupos e o tempo de exposição à TFD foi 60 segundos. O tratamento foi repetido a cada 2 dias por 5 vezes. Os autores sugeriram que a membrana nuclear da célula fúngica pode ter funcionado como uma barreira extra, prejudicando o efeito potencializador da quitosana na TFD.

A maioria das infecções por *C. albicans* está associada à sua capacidade de formar biofilmes (Tsui et al., 2016; Wall et al., 2019; Ponde et al., 2021). Um ponto crítico no estabelecimento de um biofilme é a produção e secreção de uma matriz extracelular, que atua como uma rede que ancora o biofilme, proporcionando estrutura, estabilidade e proteção. Assim, a produção de matriz extracelular é considerada um dos principais mecanismos de resistência dos biofilmes à agentes químicos antimicrobianos (Borghi et al., 2016; Tsui et al., 2016; Lohse et al., 2017; Cernáková et al., 2019). Em nosso estudo, a ação da TFD em biofilmes de *C. albicans* (cepa padrão) apresentou crescimento médio de 10,7 log de UFC/mL nos grupos controles. A aplicação da TFD com azul de metileno (AM+L+) resultou em uma inibição significativa de 2,9 log na contagem de UFC/mL quando comparado aos grupos controles. Entretanto, quando a QT foi associada à TFD (AM+QT+L+) houve uma redução de 5,3 log de UFC/mL quando comparado aos grupos controles. Novamente, resultados similares foram encontrados com a cepa clínica de *C. albicans*. Esses dados indicaram que a QT foi capaz de potencializar a ação da TFD sobre as células de *C. albicans* mesmo quando essas estavam embebidas em uma matriz extracelular de biofilmes.

Na literatura, existem outros estudos que também investigaram a ação da QT na TFD contra biofilmes, tanto de bactérias como de fungos. Entre os estudos de biofilmes bacterianos, Shrestha et al. (2012) relataram que o uso de fotossensibilizadores conjugados (rosa bengala e azul de metileno) à quitosana apresentou uma vantagem sinérgica sobre o uso de fotossensibilizadores isolados, aumentando a eficácia anti-biofilme sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, Mirfasihi et al. (2020) demonstraram que a combinação da QT e TFD foi capaz de aumentar o efeito bactericida da TFD sobre biofilmes de *Streptococcus mutans*.

Em relação aos estudos de biofilmes fúngicos, Chen et al. (2012) testaram nanopartículas de QT carregadas com eritrosina na TFD sobre *C. albicans* em células planctônicas e em biofilmes. Foi encontrada maior eficácia da TFD quando a eritrosina foi carregada com as nanopartículas de QT em relação ao uso da quitosana livre. Da mesma forma, Chien et al. (2013) avaliaram a eficácia da TFD, usando azul de toluidina como fotossensibilizador, em associação com a quitosana sobre células planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. A TFD foi realizada seguida pelo tratamento com a quitosana, conseguindo erradicar as culturas planctônicas e biofilmes quando os mesmas foram tratadas com quitosana por 30 min e 2 horas, respectivamente. No caso do estudo de Chien et al. (2013) a aplicação da quitosana ocorreu após a realização da TFD, diferentemente da metodologia utilizada em nosso estudo, no qual a TFD foi realizada na presença da QT. Provavelmente, em nosso estudo a QT associada à TFD não levou a erradicação dos biofilmes pelo tempo de tratamento com a QT ter sido inferior ao estudo de Chien et al. (2013). Além disso, os fotossensibilizadores testados foram diferentes.

Dentro do nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da quitosana como potencializador do azul de metileno na TFD contra culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Interessantemente, nossos resultados demonstraram que a QT foi capaz de potencializar a ação do AM sobre ambas as formas de crescimento planctônico e biofilmes. Os efeitos potencializadores ocorreram tanto na cepa padrão, como cepa clínica de *C. albicans*. Esses dados são relevantes uma vez que a cepa clínica de *C. albicans* utilizada neste estudo apresenta resistência ao fluconazol. Além disso, esse estudo

é pioneiro em avaliar os efeitos da TFD sobre células persistentes dos biofilmes de *C. albicans*.

As células persistentes têm sido muito estudadas atualmente, pois são variantes fenotípicas das células de *C. albicans* do biofilme, capazes de sobreviver a concentrações muito elevadas de agentes antimicrobianos, e portanto, contribuem para a resistência microbiana (Conlon et al., 2015; Wuyts et al., 2018; Denega et al., 2019). As células persistentes têm uma expressão aumentada de superóxido dismutases (SODs), que fornecem à essas células proteção contra a produção de ROS induzida pelo tratamento com antifúngicos (Bink et al., 2011). Desse modo, as células persistentes tem sido consideradas responsáveis pela recidiva de doenças infecciosas associadas à biofilmes (Lewis 2010; Fauvart et al., 2011; Figueiredo et al., 2017).

Nesse estudo, foi induzido o desenvolvimento de células persistentes de *C. albicans* com diferentes concentrações de fluconazol (100, 150 e 200X MIC). As células persistentes foram então submetidas à TFD associada ou não à quitosana. Os resultados demonstraram reduções fúngicas entre 0,8 a 1,5 log após a TFD com QT e reduções entre 0,3 a 0,5 log após a TFD sem QT. Além disso, verificamos que os tratamentos com TFD ou TFD associada à QT apresentaram maior ação antifúngica sobre as células de *C. albicans* persistentes às concentrações mais elevadas de fluconazol (200X MIC) comparadas às células persistentes as concentrações de 100 e 150X MIC. Possivelmente, as células de *C. albicans* persistentes à uma maior concentração de fluconazol tornaram-se mais susceptíveis ao tratamento com TFD devido à maiores alterações, provocadas pelo fluconazol, na membrana celular fúngica, o que pode ter facilitado a ação fotodinâmica. Além dos estudos de terapia fotodinâmica, alguns pesquisadores tem investigado a interação entre quitosana e fluconazol. Lo et al. (2020) avaliaram o potencial da QT em aumentar a atividade antifúngica do fluconazol. A combinação do fluconazol com QT apresentou uma significativa ação sinérgica na atividade inibitória sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Buscando investigar o mecanismo pelo qual a QT potencializou a ação da TFD em culturas planctônicas e biofilmes do presente estudo, foi incluído um teste de absorção do AM pelas células de *C. albicans* na presença ou ausência da QT. Quando as células de *C. albicans* foram tratadas somente com AM exibiram médias

de DO entre 0,024 e 0,058, porém, quando a QT foi associada ao AM (AM+QT+), essas médias aumentaram para 0,248 a 0,399. Ardean et al. (2021) sugeriram que os grupos amino protonados (NH_3^+) da QT são capazes de se ligar às membranas plasmáticas dos micro-organismos carregadas negativamente, levando a alterações na permeabilidade da membrana celular. Provavelmente, esse fato possa explicar a maior absorção do AM pelas células de *Candida* em contato com a QT. Este resultado pode ser comparado ao estudo de Chien et al. (2013), realizado com QT e Azul de Toluidina. Esses autores encontraram um efeito aumentado da TFD quando associada à QT sobre isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Por meio de microscopia eletrônica, os autores observaram que a QT se ligou à superfície celular de *C. albicans* tanto na presença como na ausência da TFD, porém morte celular microbiana foi encontrada apenas na presença da TFD.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, a associação da QT à TFD mediada por AM demonstra potencial para ser utilizada como tratamento adjuvante na candidose bucal.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluímos que:

- a) a quitosana foi capaz de potencializar os efeitos da TFD mediada por azul de metileno sobre culturas planctônicas, biofilmes e células persistentes de *C. albicans*;
- b) as células de *C. albicans* persistentes ao fluconazol foram menos susceptíveis à TFD do que as células em crescimento planctônico e em biofilmes;
- c) a quitosana aumentou a permeabilidade da célula de *C. albicans* ao azul de metileno, o que provavelmente potencializou o efeito antimicrobiano na TFD.

REFERÊNCIAS*

Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of oral streptococci. *Microbiol Spectr*. 2018;6(5). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.

Adler-Moore J, Lewis RE, Brüggemann RJM, Rijnders BJA, Groll AH, Walsh TJ. Preclinical safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antifungal activity of liposomal amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2019;68(Suppl 4):S244–59. doi:10.1093/cid/ciz064.

Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1884–7. doi:10.1128/AAC.01473-07.

Alves E, Faustino MA, Neves MG, Cunha A, Tome J, Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Fut Med Chem*. 2014;6(2):141–64. doi:10.4155/fmc.13.211.

Alves F, Carmello JC, Mima EGO, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Medical Mycology*. 2019;57(5):609-17. doi:10.1093/mmy/myy083.

Ardean C, Davidescu CM, Nemes NS, Negrea A, Ciopec M, Duteanu N, et al. Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7449. doi:10.3390/ijms22147449.

Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*. 2017;216(Suppl 3):S445–51. doi:10.1093/infdis/jix131.

Bartnicka D, Karkowska-Kuleta J, Zawrotniak M, Satala D, Michalik K, Zielinska G, et al. Adhesive protein-mediated crosstalk between *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis* in dual species biofilm protects the anaerobic bacterium in unfavorable oxic environment. *Sci Rep*. 2019;9(1):4376. doi:10.1038/s41598-019-40771-8.

Bink A, Vandenbosch D, Coenye T, Nelis H, Cammue BP, Thevissen K. Superoxide dismutases are involved in *Candida albicans* biofilm persistence against miconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4033-7. doi:10.1128/AAC.00280-11

Borghi E, Borgo FC, Morace G. Fungal biofilms: update on resistance. *Adv Exp Med Biol*. 2016;3:37-47. doi: 10.1007/5584_2016_7

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brancini GT, Rodrigues GB, Rambaldi MS, Izumi C, Yatsuda AP, Wainwright M, et al. The effects of photodynamic treatment with new methylene blue N on the *Candida albicans* proteome. *Photochem Photobiol Sci*. 2016;15(12):1503–13. doi:10.1039/c6pp00257a.

Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater*. 2010;6(6):2307–13. doi:10.1016/j.actbio.2009.11.003.

Calixto GMF, de Annunzio SR, Victorelli FD, Frade ML, Ferreira PS, Chorilli M, et al. Chitosan-based drug delivery systems for optimization of photodynamic therapy: a review. *AAPS PharmSciTech*. 2019; 20(7). doi:10.1208/s12249-019-1407-y.

Camacho-Alonso F, Martínez-Beneyto Y, Gallego MC, Cuello F, Buendía AJ, Pérez-Lajarin L, et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(8):627–33. doi:10.1111/jop.12435.

Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EGO, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156947. doi:10.1371/journal.pone.0156947.

Carvalho ML, Pinto AP, Raniero LJ, Costa MS. Biofilm formation by *Candida albicans* is inhibited by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), using chlorin e6: increase in both ROS production and membrane permeability. *Las Med Sci*. 2018;33:647–53. doi:10.1007/s10103-017-2344-1.

Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Front Med*. 2018;5:28. doi:10.3389/fmed.2018.00028.

Cernáková L, Dižová S, Bujdáková H. Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by *Candida albicans* strain resistant to fluconazole. *Med Mycol*. 2017;55:748–53. doi:10.1093/mmy/myw137.

Chen CP, Chen CT, Tsai T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: characterization and in vitro investigation. *Photochem Photobiol*. 2012; 88:570–6. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01101.x.

Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol*. 2013;13:217. doi:10.1186/1471-2180-13-217.

Chien HF, Chen CP, Chen YC, Chang PH, Tsai T, Chen CT. The use of Chitosan to enhance photodynamic inactivation against *Candida albicans* and its drug-resistant clinical isolates. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):7445–56. doi:10.3390/ijms14047445.

Clinical and Laboratory Standards institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard [CLSI document M07-A10]. 10th ed. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

Conlon BP, Rowe SE, Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol.* 2015;831:1-9.

Costa ACBP, Campos Rasteiro VMC, da Silva Hashimoto ESH, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(1):67-74. doi:10.1016/j.oooo.2012.02.002.

Costa TA, Andrade AL, Binotto TE, Plepis AM, Bevilacqua L, Souza WM. Clinical and morphometric evaluations of the angiogenic capacity of chitosan membrane in rabbit corneas. *Arq Bras Oftalmol.* 2006;69(6):817-21. doi:10.1590/s0004-27492006000600007.

Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* Antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms.* 2020;8(2):154. doi:10.3390/microorganisms8020154.

Da Collina GA, Freire F, Santos TPC, Sobrinho NG, Aquino S, Prates RA, et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2018;17(10):1355-64. doi:10.1039/c8pp00238j.

Daliri F, Azizi A, Goudarzi M, Lawaf S. In vitro comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene blue on *Candida albicans* colonies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:193-8. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.03.017

De Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JC, Junqueira JC. *Candida* biofilms: an update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. *Mycopathologia.* 2020;185(3):415-24. doi:10.1007/s11046-020-00445-w.

De Carvalho L, Carvalho ML, da Silva BM, Zamuner S, Alberto-Silva C, Costa MS. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using Methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:316-23. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.04.026.

Denega I, d'Enfert C, Bachellier-Bassi S. *Candida albicans* biofilms are generally devoid of persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(5):e01979-18. doi:10.1128/AAC.01979-18.

Duse L, Baghdan E, Pinnapireddy SR, Engelhardt KH, Jedelská J, Schaefer J, et al. Preparation and characterization of curcumin loaded chitosan nanoparticles for photodynamic therapy. *Phys Status Solidi A.* 2017;215(15):1700709. doi:10.1002/pssa.201700709.

- El Knidri H, Belaabed R, Addaou A, Laajeb A, Lahsini A. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *Int J Biol Macromol*. 2018;120:1181-9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139.
- Fauvart M, de Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *Int J Med Microbiol*. 2011;60(6):699-709. doi: 10.1099/jmm.0.030932-0.
- Figueiredo AMS, Ferreira FA, Beltrame CO, Côrtes MF. The role of biofilms in persistente infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit Rev Microbiol*. 2017;43:602-20. doi: 10.1080/1040841X.2017.1282941.
- Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(8):453-64. doi:10.1038/nrmicro.2017.42.
- Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, Hamblin MR. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *J Photochem Photobiol B*. 2016;159:161–8. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049.
- Fumes AC, da Silva Telles PD, Corona SAM, Borsatto MC. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:363–66. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.01.013.
- Galván Márquez I, Akuaku J, Cruz I, Cheetham J, Golshani A, Smith ML. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *Int J Food Microbiol*. 2013;164(1):108–12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025.
- Ghazal ARA, Idris G, Hajeer MY, Alawer K, Cannon RD. Efficacy of removing *Candida albicans* from orthodontic acrylic bases: an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):71. doi:10.1186/s12903-019-0765-x.
- Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2007;24(1):109-12. doi:10.1007/s10103-007-0530-2.
- Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016;18(5):310-21. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.
- Guo D, Yue H, Wei Y, Huang G. Genetic regulatory mechanisms of *Candida albicans* biofilm formation. *Chin J Biotech*. 2017;33(9):1567-81. doi:10.13345/j.cjb.170122.
- Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:67–73. doi:10.1016/j.mib.2016.06.008.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:436–50. doi:10.1039/b311900a.

Hokken MWJ, Zwaan BJ, Melchers WJG, Verweij PE. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genet Biol.* 2019;132:103254. doi:10.1016/j.fgb.2019.103254.

Hwang G, Liu Y, Kim D, Li Y, Krysan D J, Koo H. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006407. doi:10.1371/journal.ppat.1006407.

Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti MS, Baptista MS. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys.* 2002;4(11):2320–8. doi:10.1039/b109753a.

Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):445–51. doi:10.1128/AAC.01451-12.

Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome - an update for oral health professionals. *Br Dent J.* 2016;221:657–66. doi:10.1038/sj.bdj.2016.865.

Kim E, Choi JH, Yang HJ, Choi SS, Lee H, Cho YC, et al. Comparison of high and low molecular weight chitosan as in-vitro boosting agent for photodynamic therapy against *Helicobacter pylori* using methylene blue and endoscopic light. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:111-5. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.03.005.

Kragelund C, Reibel J, Pedersen AML. Oral candidiasis and the medically compromised patient. *Oral Dis.* 2016;65-77. doi: 10.1007/978-3-319-25091-5_8.

Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. *Genes.* 2018;9(9):461. doi:10.3390/genes9090461.

Kulikov SN, Lisovskaya SA, Zelenikhin PV, Bezrodnykh EA, Shakirova DR, Blagodatskikh IV, et al. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: molecular weight-activity relationship. *Eur J Med Chem.* 2014;74:169-78. doi:10.1016/j.ejmech.2013.12.017.

LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3839-46. doi:10.1128/AAC.00684-06.

Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem Rev*. 2020;121(6):3390-411. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00199.

Lepak A, Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. Time course of microbiologic outcome and gene expression in *Candida albicans* during and following in vitro and in vivo exposure to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1311-9. doi:10.1128/AAC.50.4.1311-1319.2006.

Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:357-72. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306.

Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J*. 2017;223:675–81. doi:10.1038/sj.bdj.2017.886.

Lira ALS, Torres AC. Relationship between oral candidiasis and users of dental prostheses. *Braz J Oral Sci*. 2018;17:e18150. doi:10.20396/bjos.v17i0.8652906.

Lo WH, Deng FS, Chang CJ, Lin CH. Synergistic antifungal activity of chitosan with fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and fluconazole-resistant strains. *Molecules*. 2020;25(21):5114. doi:10.3390/molecules25215114.

Lohse M, Gulati M, Johnson A, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:19–31. doi:10.1038/nrmicro.2017.107

Mansilla AY, Albertengo L, Rodriguez MS, Debbaudt A, Zuniga A, Casalongue C.A. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:6957–66. doi:10.1007/s00253-013-4993-8.

Martins KV, Gontijo SML. Treatment of denture stomatitis: literature review. *Rev Bras Odontol*. 2017;74(3):215-20. doi:10.18363/rbo.v74n3.p.215.

McCall AD, Pathirana RU, Prabhakar A, Cullen PJ, Edgerton M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019;5(1):21. doi:10.1038/s41522-019-0094-5.

Mirfasihi A, Malek Afzali B, Ebrahimi Zadeh H, Sanjari K, Mir M. Effect of a combination of photodynamic therapy and chitosan on *Streptococcus mutans* (an in vitro study). *J Lasers Med Sci*. 2020;11(4):405-410. doi:10.34172/jlms.2020.64.

Mohammadreza S. The novel applications of chitosan nanoparticles for photodynamic therapy technique. *JSMC Nanotechnol Nanomed*. 2019;3(5):1-5.

Moreira L, Lyon J, Lima A, Codognoto L, Severino D, Baptista M, et al. The methylene blue self-aggregation in water/organic solvent mixtures: relationship

between solvatochromic properties and singlet oxygen production. *Orbital*. 2017;9(4):279-89. doi:10.17807/orbital.v9i4.996.

Namangkalakul W, Benjavongkulchai S, Pochana T, Promchai A, Satitviboon W, Howattanapanich S, et al. Activity of chitosan antifungal denture adhesive against common *Candida* species and *Candida albicans* adherence on denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent*. 2019;123(1):181-7. doi:10.1016/j.prosdent.2019.09.026.

Ohshima T, Ikawa S, Kitano K, Maeda N. A proposal of remedies for oral diseases caused by *Candida*: a mini review. *Front Microbiol*. 2018;9:1522. doi:10.3389/fmicb.2018.01522.

Ozturk I, Tunçel A, Yurt F, Biyiklioglu Z, Ince M, Ocakoglu K. Antifungal photodynamic activities of phthalocyanine derivatives on *Candida albicans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:101715. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101715.

Pais P, Galocha M, Viana R, Cavaleiro M, Pereira D, Teixeira MC. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. *Microb Cell*. 2019;6(3):142-59. doi:10.15698/mic2019.03.670.

Pandya AD, Overbye A, Sahariah P, Gaware VS, Hogset H, Másson M, et al. Drug-loaded photosensitizer-chitosan nanoparticles for combinatorial chemo- and photodynamic cancer therapy. *Biomacromolecules*. 2020;21(4):1489–98. doi:10.1021/acs.biomac.0c00061.

Patel G, Crank C, Leikin J. An evaluation of hepatotoxicity and nephrotoxicity of liposomal amphotericin B (L-AMB). *J Med Toxicol*. 2011;7(1):12-5. doi:10.1007/s13181-010-0120-8.

Peng H, Huang Q, Yue H, Li Y, Wu M, Liu W, et al. The antitumor effect of cisplatin-loaded thermosensitive chitosan hydrogel combined with radiotherapy on nasopharyngeal carcinoma. *Int J Pharm*. 2019;556:97-105. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.11.068.

Perczyk P, Wójcik A, Wydro P, Broniatowski M. The role of phospholipid composition and ergosterol presence in the adaptation of fungal membranes to harsh environmental conditions—membrane modeling study. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862(2):183136. doi:10.1016/j.bbamem.2019.183136.

Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol*. 2012;116(1):1-10. doi:10.1016/j.funbio.2011.10.001.

Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(9):603-16. doi:10.1038/nrd.2017.46.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(1):193-213. doi:10.1128/CMR.00013-11.

Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol*. 2020;47(1):91-111. doi:10.1080/1040841X.2020.1843400.

Prabaharan M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. *J Biomater Appl*. 2008;23(1):5-36. doi:10.1177/0885328208091562.

Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):792-8. doi:10.1016/j.cmi.2019.03.028.

Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457–65. doi:10.1021/bm034130m.

Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(6):973–80. doi:10.1093/jac/dkf049.

Ribeiro AB, de Araújo CB, Silva LEV, Fazan-Junior R, Salgado HC, Ribeiro AB, et al. Hygiene protocols for the treatment of denture-related stomatitis: local and systemic parameters analysis - a randomized, double-blind trial protocol. *Trials*. 2019;20:2-10. doi:10.1186/s13063-019-3854-x.

Rodrigues CF, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* sp. Infections in patients with diabetes mellitus. *J Clin Med*. 2019;8(1):76. doi:10.3390/jcm8010076.

Rodrigues ME, Gomes F, Rodrigues CF. *Candida* spp./bacteria mixed biofilms. *J Fungi*. 2020;6(1):5. doi:10.3390/jof6010005.

Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surf B*. 2018;174:110-25. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.11.011.

Rolim AEH, Carvalho FAA, Costa RCC, Rosa FP. Arcabouços de quitosana: propriedades físico-químicas e biológicas para o reparo ósseo. *Rev Virtual Quim*. [Internet]. 2018 Mar-Apr [cited 2021 Mar 20]. Available from: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/RolimNoPrelo.pdf>.

Rossoni RD, Barbosa JO, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Jorge AO, Junqueira JC. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2014;29(5):1679–84. doi:10.1007/s10103-014-1570-z.

Rossoni RD, De Barros PP, Mendonça IC, Medina RP, Silva DHS, Fuchs BB, et al. The postbiotic activity of *Lactobacillus paracasei* 28.4 against *Candida auris*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:397. doi:10.3389/fcimb.2020.00397.

Sahariah P, Másson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules*. 2017;18(11):3846–68. doi:10.1021/acs.biomac.7b01058.

Sakaguchi H. Treatment and prevention of oral candidiasis in elderly patients. *Med Mycol J*. 2017;58(2):43-9. doi:10.3314/mmj.17.004.

Salehi B, Kregiel D, Mahady G, Sharifi-Rad J, Martins N, Rodrigues CF. Management of *Streptococcus mutans*-*Candida* spp. oral biofilms' infections: paving the way for effective clinical interventions. *J Clin Med*. 2020;9(2):517. doi:10.3390/jcm9020517.

Sanglard D. Finding the needle in a haystack: mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. *PLoS Pathog*. 2019;15(1):e1007478. doi:10.1371/journal.ppat.1007478.

Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol*. 2018;4(1):42-66. doi:10.3934/microbiol.2018.1.42.

Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod*. 2012;38(9):1275-8. doi:10.1016/j.joen.2012.05.006.

Silva DF, Toledo Neto JL, Machado MF, Bochnia JR, Garcez AS, Foggiano AA. Effect of photodynamic therapy potentiated by ultrasonic chamber on decontamination of acrylic and titanium surfaces. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;27:345-53. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.06.011.

Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: an overview. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;18(Suppl 1):S81-5. doi:10.4103/0973-029X.141325.

Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009;25(3):385–9. doi:10.1007/s10103-009-0706-z.

Stájer A, Kajári S, Gajdács M, Musah-Eroje A, Baráth Z. Utility of photodynamic therapy in dentistry: current concepts. *Dent J*. 2020;8:43. doi: 10.3390/dj8020043.

Sun J, Li Z, Chu H, Guo J, Jiang G, Qi Q. *Candida albicans* amphotericin B-tolerant persister formation is closely related to surface adhesion. *Mycopathologia*. 2016;181(1-2):41-9. doi: 10.1007/s11046-015-9894-1.

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1325-37. doi:10.2217/fmb.13.101.

Taraszkiewicz A, Szewczyk G, Sarna T, Bielawski KP, Nakonieczna J. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* with imidazoacridinones: influence of irradiance,

photosensitizer uptake and reactive oxygen species generation. PLoS One. 2015; 10(6):1–19. doi.org/10.1371/journal.pone.0129301.

Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. Pathog Dis. 2016;74(4):ftw018. doi:10.1093/femspd/ftw018.

Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. Carbohydr Polym. 2013;91(1):452-66. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.076.

Vara J, Gualdesi MS, Bertolotti SG, Ortiz CS. Two phenothiazine dyes as photosensitizers for the production of singlet oxygen. Photophysics, photochemistry and effects of aggregation. J Mol Struct. 2019;1181:1–7. doi:10.1016/j.molstruc.2018.12.078.

Veerapandian R, VEDIYAPPAN G. Gymnemic acids inhibit adhesive nanofibrillar mediated *Streptococcus gordonii*–*Candida albicans* mono-species and dual-species biofilms. Front Microbiol. 2019;10:2328. doi:10.3389/fmicb.2019.02328.

Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. Carbohydr Polym. 2017;164:268–83. doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.001.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: a disease of opportunity. J Fungi. 2020;6(1):15. doi:10.3390/jof6010015.

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2019;52:1-6. doi:10.1016/j.mib.2019.04.001.

Warrier A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021;33:102090. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102090.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011;3:5771. doi:10.3402/jom.v3i0.5771.

Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. Appl Environ Microbiol. 2013;79(23):7116-21. doi:10.1128/AEM.02636-13.

Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? PLoS Pathog. 2018;14(10):e1007301. doi: 10.1371/journal.ppat.1007301.

Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Vickerman M, Nobile CJ, et al. *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. Virulence. 2017;8(8):1602–17. doi:10.1080/21505594.2017.1326438.

Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Ninomiya M, Murakami K, Fujii H, et al. The pathogenic factors from oral streptococci for systemic diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4571. doi:10.3390/ijms20184571.

Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, Dominguez E, Jaromin A, Bernhardt J, et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biol.* 2018;16(10):e2006872. doi:10.1371/journal.pbio.2006872.

Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirou T, Gu W, et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Mar Drugs.* 2010;8(7):1962-87. doi:10.3390/md8071962.

Zhao HZ, Wang RY, Wang X, Jiang YK, Zhou LH, Cheng JH, et al. High dose fluconazole in salvage therapy for HIV-uninfected cryptococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):643. doi:10.1186/s12879-018-346.