

Efeito antifúngico de um metabólito de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sobre *Candida albicans* resistente a azóis

Antifungal effect of a metabolite of *Pseudomonas aeruginosa* LV strain on azole-resistant *Candida albicans*

Caroline Lucio Moreira⁰¹, Guilherme Bartolomeu-Gonçalves⁰¹, Gislaine Silva-Rodrigues⁰¹, Ane Stéfano Simionato⁰¹, Celso Vataru Nakamura⁰², Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues⁰³, Galdino Andrade⁰¹, Eliandro Reis Tavares^{01,4}, Lucy Megumi Yamauchi⁰¹, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{01*}

¹Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Londrina, Paraná, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, Paraná, Brasil.

³Universidade do Oeste Paulista, Campus II, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

⁴Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

*ogatta@uel.br

Recebido: 31 de janeiro de 2024.

Aceito: 05 de junho de 2024.

Publicado: 12 de agosto de 2024.

RESUMO

Candida albicans permanece como agente mais comum de candidíase em todo o mundo. Essa levedura é geralmente sensível à maioria dos antifúngicos, entretanto o surgimento de *C. albicans* resistentes aos azóis tem sido relatado. Além disso, esse microrganismo pode formar biofilmes em diversas superfícies, dificultando o tratamento das infecções. Neste estudo, avaliou-se o efeito de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV em células planctônicas e sésseis de *C. albicans*, com diferentes genótipos e perfil de sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da fração semipurificada F4a variaram de 1,56 a 6,25 µg/mL e 6,25 a 25 µg/mL, respectivamente. Fluopsina C parece ser o componente antifúngico de F4a. A fração semipurificada e fluopsina C apresentaram atividade fungicida dose e tempo dependentes. F4a causou graves danos à morfologia e à ultraestrutura das células fúngicas planctônicas, e reduziu significativamente a viabilidade de biofilmes de 24 horas, com CIM para células sésseis de 12,5 a 25,0 µg/mL. Detectou-se, entretanto, citotoxicidade em células de mamíferos para F4a e fluopsina C em concentrações que apresentaram atividade antifúngica. Estes resultados indicam que a fluopsina C pode ser um protótipo para o desenvolvimento de novos antifúngicos para *C. albicans*.

Palavras-chave: Antibiofilme. Atividade antimicrobiana. Fluopsina C. Fungicida.

ABSTRACT

Candida albicans remains the most common agent of candidiasis worldwide. This yeast is generally sensitive to most antifungals, however, the emergence of azole-resistant *C. albicans* has been reported. In addition, this microorganism can form biofilms on various surfaces, making it difficult to treat infections. In this study, the effect of secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* strain LV on planktonic and sessile cells of *C. albicans*, with different genotypes and susceptibility profile to fluconazole and voriconazole, was evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the semi-purified fraction F4a ranged from 1.56 to 6.25 µg/mL and 6.25 to 25 µg/mL, respectively. Fluopsin C appears to be the antifungal component of F4a. The semi-purified fraction and fluopsin C showed fungicidal activity, dose and time dependent. F4a caused severe damage to the morphology and ultrastructure of planktonic fungal cells, and significantly reduced the viability of 24-hour biofilms, with MIC for sessile cells from 12.5 to 25.0 µg/mL. However, cytotoxicity was detected in mammalian cells for F4a and fluopsin C at concentrations that showed antifungal activity. These results indicate that fluopsin C may be a prototype for the development of new antifungals for *C. albicans*.

Keywords: Antibiofilm. Antimicrobial activity. Fluopsin C. Fungicide.

INTRODUÇÃO

Candida albicans pode interagir com hospedeiros de sangue quente como um membro comensal da microbiota, frequentemente colonizando a pele e as membranas mucosas (Ward et al., 2018), ou como um patógeno oportunista, causando uma variedade de manifestações clínicas (Lopes & Lionakis, 2022). Notavelmente, a candidíase invasiva está associada a altas taxas de mortalidade (Bretagne et al., 2022). A colonização por *C. albicans* representa risco significativo de infecção em humanos (Patel, 2022).

O fluconazol, um antifúngico triazólico, possui amplo espectro de ação, solubilidade em água, alta biodisponibilidade e pode ser administrado por via oral ou intravenosa, com alta penetração no sistema nervoso central e com baixos efeitos adversos (Shafiei, Peyton, Hashemzadeh & Foroumadi, 2020). Devido a essas características, esse antifúngico tem sido recomendado para tratar várias infecções fúngicas, incluindo as causadas por *C. albicans* (Shafiei et al., 2020). No entanto, ao longo das últimas décadas, seu uso aumentado para profilaxia e tratamento da candidíase impôs uma pressão seletiva que contribuiu para o surgimento de isolados resistentes (Sharifi et al., 2023).

Além da resistência das células planctônicas, os biofilmes representam desafio na terapia das infecções por *C. albicans*, uma vez que esse modo de crescimento exibe sensibilidade reduzida aos agentes antifúngicos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro

(Fan et al., 2022), levando a infecções persistentes e de difícil tratamento, associadas a altas taxas de mortalidade (Atienza-Carrera, Cabezas-Mera, Tejera & Machado, 2022). Diante desse cenário, a priorização de *C. albicans* como um patógeno fúngico significativo pela Organização Mundial da Saúde ressalta a necessidade urgente do avanço de novas abordagens de controle para esse microrganismo (World Health Organization, 2022).

Historicamente, os metabólitos secundários produzidos por microrganismos têm contribuído para a descoberta de novos antibióticos (Bansal et al., 2021). Entre esses microrganismos, as espécies de *Pseudomonas* produzem ampla variedade de moléculas bioativas com uso potencial na medicina e na agricultura (Gross & Lopes, 2009; Afonso et al., 2022).

Pesquisas anteriores mostraram que metabólitos secundários derivados do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV exibem potentes propriedades antibacterianas contra patógenos de plantas (Afonso et al., 2022), bem como contra patógenos humanos, tanto bactérias (Kerbaui et al., 2016; Navarro et al., 2019; Bartolomeu-Gonçalves et al., 2022) quanto fungos (Spoladori et al., 2023), incluindo cepas multirresistentes.

No presente estudo, investigou-se o potencial antifúngico de metabólitos secundários obtidos de *P. aeruginosa* cepa LV sobre células planctônicas e sésseis (biofilme) de *C. albicans*, exibindo diferentes perfis de sensibilidade aos azóis. Além disso, o efeito dos metabólitos bacterianos na formação

de tubos germinativos de *C. albicans* e sua toxicidade para células mamíferas também foram investigados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

A cepa *P. aeruginosa* LV foi cultivada em ágar nutriente suplementado com 0,01% de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6,8 a 28 °C, por 48 horas. Dezesesseis isolados de *C. albicans*, obtidos da cavidade oral de indivíduos saudáveis ($n = 4$), de diabéticos ($n = 4$) e de HIV positivos ($n = 3$), de secreção vaginal ($n = 2$) e de secreção peritoneal ($n = 3$), foram incluídos neste estudo. Esses isolados foram escolhidos aleatoriamente a partir da coleção fúngica do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

As cepas de referência *C. albicans* ATCC 10231 (resistente ao fluconazol e ao voriconazol, www.atcc.org/resources/brochures) e *C. albicans* ATCC 26790 (resistente ao fluconazol e ao voriconazol) (Eldesouky, Mayhoub, Hazbun & Seleem, 2018) também foram incluídas. Todos os isolados e as cepas de referência de *C. albicans* foram cultivados em meio de cultura Sabouraud dextrose (SD) a 37 °C, por 24 horas.

Antes dos experimentos, três a cinco colônias fúngicas foram cultivadas em caldo Sabouraud sob as mesmas condições. Uma suspensão padrão foi preparada, centrifugando-se as células fúngicas (10.000 x g por 1 minuto) e ressuspensando-as em solução salina para a obtenção de uma turbidez padrão de 0,5 na escala de McFarland (DensiCHEK™ PLUS, bioMérieux). Essa suspensão foi, então, diluída em meio de cultura, obtendo-se os inóculos para os ensaios. As células bacterianas e fúngicas foram armazenadas a -80 °C em caldo nutriente (CN) e caldo Sabouraud, respectivamente, contendo 30% de glicerol.

Purificação da F4a e da Fluopsina C

A fração 4a (F4a) e a fluopsina C (metabólitos secundários) foram obtidas a partir da cultura de *P. aeruginosa* cepa LV, conforme descrito por Bedoya et al. (2019). De forma resumida, células planctônicas em fase logarítmica foram cultivadas em CN suplementado com 0,01% de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6,8 a 28 °C, por dez dias. Após esse período, as células foram sedimentadas por centrifugação (4500 x g, por 20 minutos). A F4a foi isolada a partir do sobrenadante livre de células por extração, com diclorometano e purificação por cromatografia *flash* em gel de sílica (diclorometano de etila 1:1, v/v).

A fluopsina C foi purificada a partir da F4a, por meio de outra cromatografia em gel de sílica (éter de petróleo:diclorometano:éter etílico, 65:25:10) e cromatografia líquida de alta performance (CLAE) semipreparativa. A identificação da fluopsina C baseou-se em: espectros de massa obtidos com um espectrômetro de massa ESI-MS Quattro LCZ (Micromass, Manchester, Reino Unido); espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , usando um espectrômetro Bruker Avance III de 400 MHz; microanálise por espectroscopia de raios-X (EDS) realizada, utilizando um microscópio eletrônico de varredura FEI-Quanta 200, com uma tensão de aceleração de 25 kV (Navarro et al., 2019). Todos os produtos foram preparados como soluções de 4,0 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, EUA).

DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

A relação genética entre os isolados de *C. albicans* e as cepas de referência foi determinada por DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), utilizando os iniciadores CA1 e CA2, conforme Noumi et al. (2009). O DNA genômico foi isolado com o auxílio do *kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen,

Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Os perfis de bandas foram categorizados usando o coeficiente de Dice do software Gel J (Heras et al., 2015), com uma tolerância de banda configurada em 3% e o valor de corte de limiar estabelecido em 95% (Morey et al., 2016).

Atividade antifúngica contra células planctônicas

A concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol (Merck, Brasil), de voriconazol (Merck, Brasil), de F4a e de fluopsina C foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2017). Os testes foram realizados em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI, Sigma-Aldrich, Brasil), sem bicarbonato de sódio e tamponado com 0,164 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS, Sigma-Aldrich, Brasil) (RPMI-MOPS) pH 7,0. As concentrações dos compostos variaram de 0,098 a 50,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para metabólitos bacterianos, de 0,25 a 128,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fluconazol e de 0,031 a 16,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para voriconazol. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída nesses experimentos como controle de qualidade.

Em cada ensaio, dois poços das placas de 96 poços foram utilizados como controles de crescimento (meio de cultura, 1,25% de DMSO e inóculo) e de esterilidade (meio de cultura e 1,25% de DMSO). Os pontos de corte de sensibilidade para os azóis foram interpretados de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2022). Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM) dos metabólitos bacterianos, uma alíquota de 10 μL foi retirada de cada poço que não apresentou crescimento visível no teste de CIM e inoculada em ágar SD (Spoladori et al., 2023). A CFM foi estabelecida como a menor concentração que não resultou em crescimento de colônias após 24 horas, a 37 °C. Os experimentos foram realizados em duplicata em três ocasiões diferentes. Com base nos perfis de sensibilidade aos azóis, quatro isolados clínicos (4L, 1S, 3S e 82) e as cepas de referência foram selecionados para análises adicionais.

Cinética de tempo morto

Para determinar a cinética de crescimento de células planctônicas na presença de F4a ou fluopsina C, células fúngicas ($0,5 - 2,5 \times 10^3$ células) foram incubadas nos valores de CIM e CFM a 37 °C. Em pontos de tempo específicos (4, 8, 16 e 24 horas), 10 μL de cada tratamento foram retirados e diluídos em série (1:10), em solução salina. Cada diluição (10 μL) foi inoculada em ágar SD. As contagens de UFC foram realizadas após 24 horas de incubação a 37 °C (Barry et al., 1999). Para avaliar o efeito fungicida, os dados foram plotados como \log_{10} UFC/mL versus tempo (horas). Um composto foi classificado como fungicida se causasse uma redução de $3 - \log_{10}$ (99,9%) no inóculo fúngico inicial (UFC/mL) (Klepser, Ernst, Lewis, Ernst & Pfaller, 1998).

Viabilidade de *Candida albicans*

Um inóculo de 3×10^7 UFC/mL de *C. albicans* foi tratado com a CIM e CFM da fração F4a, em 4 mL de meio RPMI 1640 pH 7,0, pelo período de 12 horas. Após esse período, as células foram incubadas em presença da combinação dos corantes fluorescentes FUN® 1 (10 μM) e Calcofluor® White M2R (25 μM) do *kit LIVE/DEAD® Yeast Viability* (ThermoFisher Scientific, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. As células de *C. albicans* foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager 2), utilizando filtros de fluoresceína com excitação de 480 nm e emissão ≥ 530 nm.

Microscopia eletrônica de transmissão de células planctônicas de *Candida albicans*

As células de *C. albicans* foram tratadas com F4a (CIM e CFM) a 37 °C por 12 horas. As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) à temperatura ambiente. As amostras foram, então, fixadas em uma solução contendo tampão de cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,2), OsO₄ a 2%, ferrocianeto de potássio a 1,6% e CaCl₂ a 10 mM por 30 minutos, à temperatura ambiente. As células fúngicas foram desidratadas em acetona, emblocadas em resina EPON™, seccionadas finamente usando um ultramicrotomo Leica, coradas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo, e observadas em microscópio eletrônico de transmissão TECNAI12-FEI (Endo, Cortez, Ueda-Nakamura, Nakamura & Dias Filho, 2010).

Formação de tubos germinativos

As células fúngicas (2,5 x 10³ UFC/mL) foram incubadas em caldo SD suplementado com F4a ou fluoposina C (valores de 0,5xCIM) a 37 °C, por duas horas. Em seguida, uma alíquota de 50 µL dessa suspensão celular foi incubada em 500 µL de soro fetal bovino (SFB, Gibco) a 37 °C, por três horas, para induzir a formação de tubos germinativos. Uma alíquota foi transferida para uma lâmina de microscopia e analisada sob microscópio de luz (Olympus BX53) com aumento de 400x. A formação de tubos germinativos foi avaliada por meio da contagem do número de células individuais, contendo um tubo de crescimento, sem constrição no ponto de emergência, com pelo menos o dobro do comprimento da célula. O resultado foi expresso como uma porcentagem da população total de células (Endo et al., 2010).

Formação e tratamento do biofilme de *C. albicans*

Biofilmes de *C. albicans* foram formados em microplacas de poliestireno de 96 poços (Techno Plastic Products, Suíça). Uma alíquota de 20 µL da suspensão fúngica padrão foi colocada em cada poço da placa, contendo 180 µL de caldo SD. As microplacas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após este período, os biofilmes foram lavados suavemente com tampão fosfato esterilizado de 100 mM, 0,15 M de NaCl, pH 7,2 (PBS) para remover células não aderentes. Após a lavagem, uma alíquota (200 µL) de caldo SD contendo diferentes concentrações de F4a ou fluoposina C (3,12 - 100 µg/mL) foi adicionada. Os biofilmes foram incubados por mais 24 horas.

Em seguida, o meio de cultura foi removido. O biofilme foi lavado duas vezes com PBS. Biofilmes não tratados foram usados como controle (Bizerra et al., 2008). A atividade metabólica dos biofilmes foi determinada pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Merck, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade metabólica dos biofilmes foi expressa como uma porcentagem, conforme a equação: $\frac{DO_{\text{biofilme tratados}}}{DO_{\text{controle não tratado}}} \times 100$, em que a DO do controle não tratado representa 100% de viabilidade celular. As concentrações inibitórias mínimas capazes de reduzir 50% e 90% da atividade metabólica das células sésseis foram consideradas SCIM₅₀ e SCIM₉₀, respectivamente. O experimento foi realizado em quintuplicata em duas ocasiões diferentes.

Efeito da F4a e da fluoposina C em células de mamíferos

A citotoxicidade da F4a ou fluoposina C para a linhagem celular HeLa (adenocarcinoma epitelial de colo de útero) foram analisadas, conforme descrito por Bartolomeu-Gonçalves et al. (2022), com modificações. Resumidamente, as células foram cultivadas em uma placa de microtitulação de fundo chato

de 96 poços, contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado, com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% de tilosina e 5% de CO₂ a 37 °C, por 48 horas. Depois disso, o sistema foi lavado suavemente com PBS esterilizado, para remover células não aderentes. O meio de cultura, contendo diferentes concentrações de F4a ou fluoposina C (0,062 a 2,0 µg/mL), foi adicionado. As células foram incubadas por mais 24 horas. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de redução do MTT, de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração dos compostos necessária para inibir células viáveis em até 50% foi calculada por análise de regressão. O valor foi considerado a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀).

Análise estatística

O software GRAPHPAD PRISM versão 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado para as análises estatísticas. Para o teste de microdiluição em caldo, os valores de CIM e CFM dos grupos sensíveis e resistentes ao fluconazol e voriconazol foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Para a curva de morte, foi utilizado ANOVA Two-Way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Quanto aos biofilmes, os valores médios foram testados por ANOVA One-Way. P-valores menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

F4a inibe o crescimento de células planctônicas de *C. albicans*, exibindo diferentes genótipos e perfis de sensibilidade a compostos azólicos. A fluoposina C parece ser um dos componentes ativos

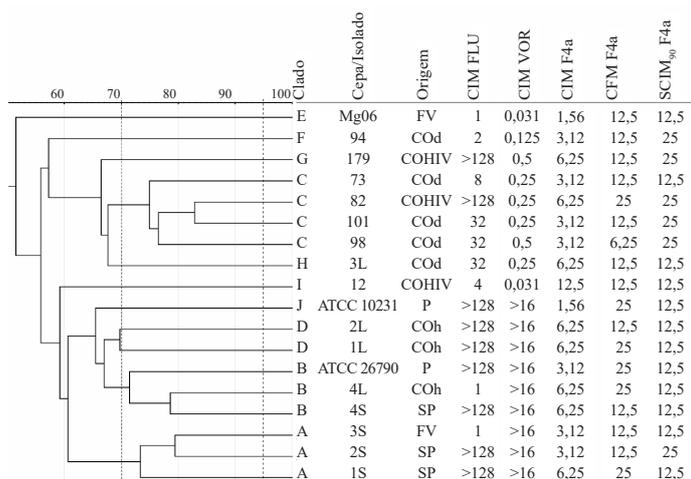
No presente estudo, avaliamos o efeito antifúngico da fração F4a obtida a partir de sobrenadante de cultura de *P. aeruginosa* cepa LV, cultivada em meio de cultura enriquecido com cobre. Primeiramente, analisamos a relação genética dos isolados de *C. albicans*. A observação visual das bandas geradas por RAPD, usando os oligonucleotídeos iniciadores CA1 e CA2 (Noumi et al., 2009), revelou alta diversidade genética entre os isolados e as cepas de referência. Utilizando um valor de corte de 95% (Morey et al., 2016), todas as cepas e os isolados de *C. albicans* apresentaram perfis de impressões digitais de DNA RAPD únicos, indicando sua baixa relação genética. Três clusters (D, J e K) foram identificados, usando um valor de corte de 70%. Quatro, três e três isolados foram agrupados nos clusters D, J e K, respectivamente. Os outros sete isolados e *C. albicans* ATCC 10231 tiveram perfis de bandas únicos (Figura 1).

Na sequência, determinamos a sensibilidade de todos os isolados de *C. albicans* a dois antifúngicos azólicos. Os valores de CIM de fluconazol e de voriconazol variaram de 1 a > 128 µg/mL e de 0,031 a > 16 µg/mL, respectivamente. De acordo com os pontos de corte antifúngicos do CLSI (2022), entre 16 isolados de *C. albicans*, foram 11 (68,8%) resistentes ao fluconazol (CIM ≥ 8 µg/mL), quatro foram sensíveis (25,0%) (CIM ≤ 2 µg/mL) e um (6,3%) foi sensível dose-dependente (CIM = 4 µg/mL). Em relação ao voriconazol, sete (43,8%) foram resistentes (CIM ≥ 1 µg/mL), seis (37,5%) foram intermediários (CIM 0,25-0,5 µg/mL) e três (18,8%) foram sensíveis (CIM ≤ 0,125 µg/mL). As cepas de referência foram resistentes a ambos os compostos azólicos, validando os resultados (Figura 1).

F4a inibiu o crescimento de todas *C. albicans*. Os valores de CIM variaram de 1,56 a 12,5 µg/mL e a CFM variou de 6,25 a 25,0 µg/mL. Exceto o isolado 12, cujo valor de CIM e de CFM foi 12,5 µg/mL. Para os outros isolados e as cepas de referência, a CFM foi pelo menos duas vezes maior que a CIM (Figura 1).

Figura 1

Características genotípicas e perfis de sensibilidade ao fluconazol, voriconazol e F4a para *Candida albicans* de diferentes origens.



Fonte: Os autores.

Nota. A análise de agrupamento dos padrões de impressão digital de DNA por RAPD foi realizada, utilizando o coeficiente de Dice do *software* Gel J (Heras et al., 2015), com uma tolerância de banda definida em 3% e um valor de corte de limiar definido em 95% (Morey et al., 2016). A concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol (FLU), de voriconazol (VOR) e de F4a foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI (2020). A concentração fungicida mínima (CFM) de F4a foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias em ágar Sabouraud dextrose (Spoladori et al., 2023). A concentração inibitória mínima de células sésseis (SCIM₉₀) de F4a foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (Bizerra et al., 2008). Os valores de CIM, CFM e SCIM são expressos em $\mu\text{g/mL}$. Sendo FV: fluido vaginal; COd: cavidade oral de indivíduo com *Diabetes mellitus*; COhiv: cavidade oral de indivíduo portador de HIV; COh: cavidade oral de indivíduo saudável; P: pulmão; SP: secreção peritoneal.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos valores de CIM e de CFM da F4a para *C. albicans* com diferentes perfis de sensibilidade aos azóis e diferentes genótipos. Os valores de CIM e de CFM da F4a também apresentaram diferenças estatisticamente insignificativas ao comparar o sítio anatômico de isolamento de *C. albicans* ($p>0,05$). Portanto quatro isolados clínicos (4L e 3S – resistentes ao voriconazol; 1S – resistente a ambos os azóis e 82 – resistente ao fluconazol e intermediário ao voriconazol) e as cepas de referência foram selecionados para análises adicionais com células planctônicas.

Estudos anteriores mostraram que os metabólitos secundários de *P. aeruginosa* inibem o crescimento planctônico de *C. albicans* (Egawa, Umino, Ito & Okuda, 1971; Kerr et al., 1999; Salvatori et al., 2020). F4a é composta por uma mistura de fenazina-1-carboxiamida, ácido fenazina-1-carboxílico, indolin-3-ona e o composto contendo cobre fluopsina C (Bedoya et al., 2019; Navarro et al., 2019). Logo, para investigar qual composto é responsável pela atividade antifúngica, testamos cada um separadamente, em células planctônicas das cepas de referência de *C. albicans*. Apenas a fluopsina C inibiu o crescimento de *C. albicans*, exibindo valores de CIM e de CFM de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (ATCC 10231); 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ (ATCC 26790), respectivamente, indicando que esse composto contendo cobre é o componente antifúngico ativo da F4a.

A fluopsina C foi inicialmente isolada e caracterizada a partir da cepa *Pseudomonas* MCRL 10107, cultivada na presença de cobre. Foi nomeada como antibiótico YC 73, pois inibiu o crescimento de várias espécies bacterianas e fúngicas, incluindo *C. albicans* (CIM = 3,12 $\mu\text{g/mL}$) (Egawa, Umino, Awataguchi, Kawano & Okuda, 1970; Egawa et al., 1971). Posteriormente, a fluopsina C foi isolada de *Pseudomonas fluorescens* KY 403 (primeira vez em que o antibiótico foi denominado fluopsina) (Itoh, Inuzuka & Suzuki, 1970), *Pseudomonas reptilivora*

(Del Rio, Gorgé, Olivares & Mayor, 1972), *Streptomyces* sp. (antibiótico n. 4601) (Otsuka, Niwayama, Tanaka, Take & Uchiyama, 1971) e *P. aeruginosa* PAO1 (Patteson et al., 2021).

Assim como nos estudos de Egawa et al. (1970), esses autores relataram a atividade antimicrobiana da fluopsina C em células planctônicas de várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A fluopsina C purificada a partir da cepa *P. aeruginosa* LV também inibiu o crescimento de várias espécies bacterianas resistentes a antibióticos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (Kerbaux et al., 2016; Navarro et al., 2019; Bartolomeu-Gonçalves et al., 2022).

Recentemente, relatamos a atividade antifúngica de F4a contra *Candida auris* CBS 10913 (sensível ao fluconazol e à anfotericina B) e *C. auris* CBS 12766 (resistente ao fluconazol e à anfotericina B). Apenas a fluopsina C (CIM = 3,12 $\mu\text{g/mL}$ e CFM = 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e a indolin-3-ona (CIM = 100 $\mu\text{g/mL}$ e CFM = 200 $\mu\text{g/mL}$) inibiram o crescimento dessa espécie de levedura. Além disso, a fluopsina C e a indolin-3-ona apresentaram uma interação antifúngica sinérgica em células planctônicas de *C. auris* (Spoladori et al., 2023). Em conjunto, estes resultados indicam o potencial da fluopsina C como ponto de partida para o desenvolvimento de novos compostos destinados ao controle de microrganismos resistentes a antimicrobianos.

Em contraste com nossos resultados, Kerr et al. (1999) relataram o efeito antifúngico de 1-hidroxifenazina obtida de *P. aeruginosa*, exibindo valores de CIM de 25,0 $\mu\text{g/mL}$ e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. Esses resultados indicam que substituintes na posição C1 da molécula de fenazina podem afetar o efeito antifúngico, enquanto a presença de hidroxila é mais eficaz na inibição do crescimento de células planctônicas de *C. albicans*, em comparação com grupos carbamóil (fenazina-1-carboxiamida) e carboxila (ácido fenazina-1-carboxílico). Por sua vez, Salvatori et al. (2020) relataram que compostos de fenazina (piocianina e metossulfato de fenazina) interferiram na filamentação de *C. albicans* e na sobrevivência no interior de macrófagos.

F4a e fluopsina C apresentam efeito fungicida dose e tempo dependentes contra células planctônicas

A cinética de crescimento das células planctônicas de *C. albicans* na presença de F4a ou de fluopsina C foi monitorada durante 24 horas, a 37 °C, para avaliar a natureza e a extensão do efeito antifúngico (Figura 2). No geral, mediante aos valores de CIM de F4a, foi observada a inibição do crescimento de *C. albicans* ao longo do tempo, em comparação com as células de controle não tratadas. Diferenças de pelo menos 4log₁₀ UFC foram observadas nas contagens de UFC entre células não tratadas e tratadas após 24 horas para todas as cepas/isolados de *C. albicans*. Por outro lado, frente à CFM de F4a, as contagens de UFC foram zero após 24 horas (as cepas de referência) (Figuras 2a e 2b), quatro horas (isolados 1S e 3S) (Figuras 2c e 2d) e 16 horas (isolados 4L e 82) (Figuras 2e e 2f).

Escolhemos a cepa de referência *C. albicans* ATCC 10231 para comparar a cinética de morte celular causada pela fluopsina C. Semelhante à F4a, a fluopsina C exibiu um efeito fungicida dose e tempo dependentes em células planctônicas. As contagens de UFC foram zero após 24 horas de incubação (Figura 2g), corroborando que o efeito antifúngico da F4a é atribuído à presença desse composto contendo cobre.

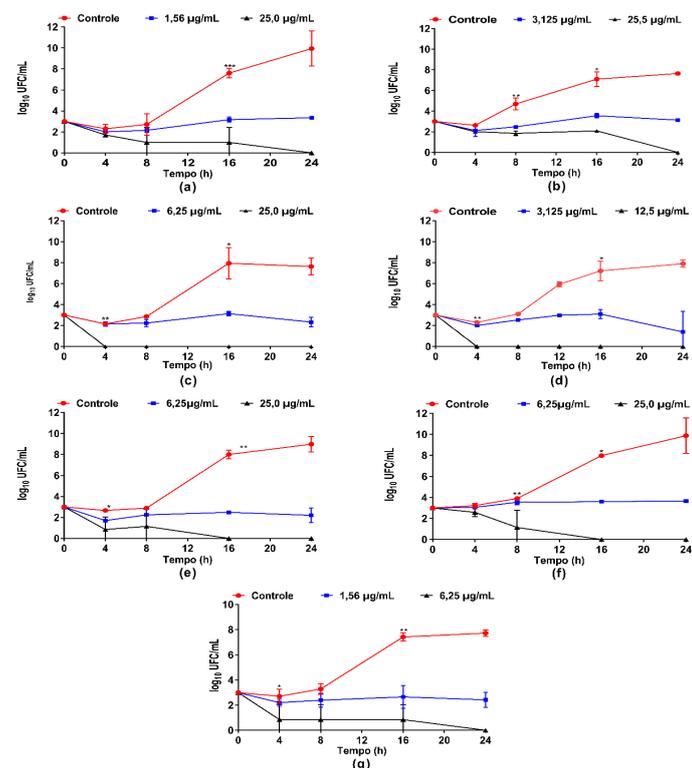
O efeito fungicida da F4a foi visualizado com maior detalhe após a marcação diferencial, usando as sondas

fluorescentes FUN-1™ e Calcofluor™ White M2R, de *C. albicans* ATCC 10231, cultivadas na presença da CIM e da CFM da F4a. As imagens corroboraram o caráter dose-dependente da atividade fungicida de F4a. As Figuras 3a e 3b mostram células planctônicas não tratadas com morfologia típica de levedura, exibindo estruturas vacuolares avermelhadas, indicando membranas intactas e atividade metabólica preservada.

Da mesma forma, a partir do tratamento com a CIM de F4a (1,56 µg/mL), nenhuma alteração morfológica foi observada. As células apresentaram estruturas intravacuolares vermelho-alaranjadas (Figuras 3e e 3f), corroborando a natureza fungistática do composto. Por outro lado, as células tratadas com a CFM de F4a (25 µg/mL) exibiram fluorescência verde difusa (Figuras 3i e 3j), indicando a ausência de atividade metabólica nessas células.

Figura 2

Atividade antifúngica da F4a contra células planctônicas de *Candida albicans*.



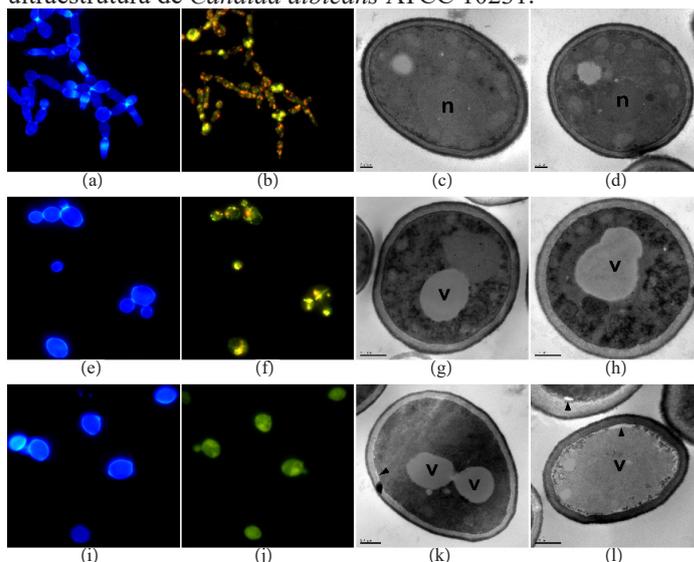
Fonte: Os autores.

Nota. Curvas de tempo de morte de *C. albicans* ATCC 10231 (a) e *C. albicans* ATCC 26790 (b), e os isolados clínicos: IS (c), 3S (d), 4L (e), 82 (f) na presença da CIM e da CFM de F4a por 24 horas, a 37 °C. Curva de tempo de morte de *C. albicans* ATCC 10231 (g) na presença da CIM e da CFM de fluopsina C por 24 horas, a 37 °C. As contagens de UFC foram realizadas nos tempos especificados. *Valor de $p < 0,05$, **Valor de $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, em comparação com as células não tratadas.

As alterações morfológicas e ultraestruturais das células planctônicas induzidas por F4a também foram analisadas por TEM. As células de controle não tratadas exibiram morfologia típica, com parede celular compacta e membrana celular intacta, com densidade eletrônica regular (Figuras 3c e 3d). O tratamento com F4a com a CIM causou desorganização do citoplasma e aumento no tamanho dos vacúolos, bem como em Figuras 3g e 3h. Intensa desorganização do citoplasma, aumento do número de vacúolos e desprendimento da membrana plasmática foram observados em *C. albicans* tratadas com a CFM de F4a (Figuras 3k e 3l). Alterações morfológicas e ultraestruturais semelhantes também foram observadas em *C. auris* após o tratamento com F4a (nos valores de CIM e de CFM) (Spoladori et al., 2023). Estudos adicionais são necessários para elucidar o modo de ação da fluopsina C em espécies de *Candida*.

Figura 3

Efeito da F4a sobre a viabilidade celular, morfologia e ultraestrutura de *Candida albicans* ATCC 10231.



Fonte: Os autores.

Nota. A viabilidade das células de *C. albicans* foi analisada após a marcação diferencial com corantes FUN-1™ e Calcofluor White™ MR2. Células planctônicas foram incubadas sem (a, b), com a CIM (e, f) e CFM (i, j) de F4a por 12 horas. Células contendo estruturas intravacuolares vermelhas fluorescentes (b, f) representam leveduras metabolicamente ativas; fluorescência azul (a, e, i) indica a parede celular de células viáveis e não viáveis. Células com fluorescência verde-alaranjada difusa (j) caracterizam células metabolicamente inativas. Aumento de 400x. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células não tratadas de *C. albicans* (c, d) exibiram morfologia esférica típica, mostrando uma parede celular compacta com densidade eletrônica regular. O efeito do tratamento com F4a com concentrações de CIM (g, h) e de CFM (k, l) por 12 horas revelou desorganização citoplasmática, aumento de vacúolos e desprendimento da membrana celular (seta preta). Sendo n: núcleo; v: vacúolos. Barras: 0,5 µm.

A F4a e a fluopsina C inibem a formação de tubo germinativo de *Candida albicans*

A capacidade de *C. albicans* de variar entre as duas formas morfológicas reversíveis (levedura para estruturas filamentosas) em resposta a diversas condições ambientais do hospedeiro é um traço de virulência bem estabelecido (Noble, Gianetti & Witchley, 2017). Tradicionalmente, as formas filamentosas (pseudohifas e hifas) têm sido associadas ao estilo de vida patogênico, enquanto as formas de levedura foram encontradas como comensais (Moyes et al., 2010).

No entanto, a transição entre as formas leveduriforme e filamentosas parece contribuir para a candidíase disseminada. De fato, estudos anteriores mostraram que *C. albicans* mantidas nas formas leveduriforme ou filamentosas mostraram-se fortemente atenuadas para virulência em um modelo de camundongo de candidíase disseminada (Saville, Lazzell, Monteagudo & Lopez-Ribot, 2003). Nesse sentido, as células leveduriformes podem se disseminar pelo sangue, enquanto as formas filamentosas podem invadir e danificar órgãos internos (Saville et al., 2003). Fatores ambientais, como temperatura, pH e meio de cultura, podem induzir a transição de levedura para hifa em *C. albicans* (Noble et al., 2017).

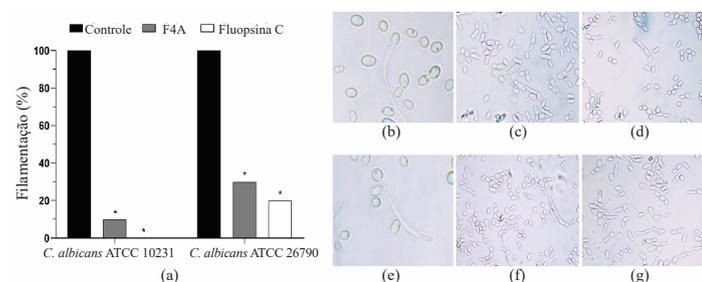
Neste estudo, avaliamos o efeito de F4a e de fluopsina C na formação de tubos germinativos pelas cepas de referência de *C. albicans*, usando SD suplementado com SFB. A exposição prévia das cepas de referência a concentrações subinibitórias (0,5xCIM) de F4a ou de fluopsina C por duas horas inibiu significativamente a formação de tubos germinativos por *C. albicans* (Figura 4). F4a inibiu cerca de 90% e de 70% da formação de tubos germinativos na ATCC 10231 e na ATCC 26790, respectivamente.

Da mesma forma, fluopsina C inibiu 100% e 80%

desse processo na ATCC 10231 e na ATCC 26790 (Figura 4a). Imagens de microscopia óptica (Figuras 4b a 4g) corroboram o efeito inibitório da F4a e da fluopsina C na formação de tubos germinativos em *C. albicans*. Estes resultados indicam que ambos os compostos podem afetar a virulência de *C. albicans*, exibindo, assim, atividade “antivirulência”.

Figura 4

Efeito da F4a e fluopsina C sobre a formação de tubos germinativos em *Candida albicans*.



Fonte: Os autores.

Nota. (a) Representação gráfica da formação de tubos germinativos na presença de F4a e de fluopsina C em valores de 0,5xCIM. * $p < 0,001$ comparado com as células de levedura não tratadas. Imagens de microscopia de tubos germinativos em *C. albicans* ATCC 10231 (b, c, d) e *C. albicans* ATCC 26790 (e, f, g). Células planctônicas não tratadas (b, e) e tratadas por duas horas, com valores de 0,5xCIM de F4a (c, f) e de fluopsina C (d, g), foram incubadas na presença de soro fetal bovino a 37 °C, por três horas. Aumento de 400x.

A F4a e a fluopsina C inibem biofilmes maduros de *Candida albicans*

Além de seu papel na patogênese da candidíase disseminada, as hifas, juntamente com as leveduras e pseudohifas, estão presentes nos biofilmes formados por *C. albicans*, uma característica de importância clínica crítica (Fan et al., 2022). Os biofilmes de *C. albicans* são altamente resistentes à maioria dos agentes antifúngicos disponíveis e às moléculas de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (Bizerra et al., 2008; Fan et al., 2022). Os mecanismos de resistência das células sésseis são multifatoriais e, em geral, estão relacionados ao aprisionamento de antifúngicos pela matriz do biofilme, à superexpressão de genes codificadores de resistência, à formação de biofilmes polimicrobianos e à formação de vesículas extracelulares (Bizerra et al., 2008; Fan et al., 2022).

No presente estudo, o tratamento com diferentes concentrações de F4a reduziu a atividade metabólica das células sésseis de *C. albicans*, conforme observado na Figura 5. Para sete isolados e ATCC 26790 (44,4%), observou-se redução significativa ($p < 0,05$) da atividade metabólica em uma concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Para três e ATCC 10231 (22,2%), três (16,7%) e três (16,7%) isolados, observou-se diminuição significativa na atividade metabólica a partir de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ e de 25,0 $\mu\text{g/mL}$. A SCIM₉₀ dos isolados e das cepas de referência variou de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ a 25,0 $\mu\text{g/mL}$. Para a maioria dos isolados (66,7%), a SCIM₉₀ foi igual a 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Para sete isolados (43,75%), a SCIM₉₀ foi idêntica à CFM (Figura 1).

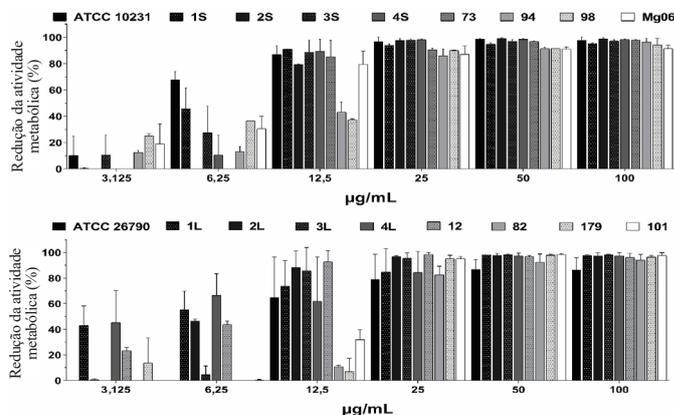
Também avaliamos o efeito da fluopsina C em biofilmes de 24 horas de *C. albicans* ATCC 10231 (dados não mostrados). Redução de aproximadamente 60% foi verificada na atividade metabólica das células sésseis após o tratamento com 3,12 $\mu\text{g/mL}$ de fluopsina C. A SCIM₉₀ foi de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, valor ligeiramente inferior ao obtido para F4a (SCIM₉₀ = 12,5 $\mu\text{g/mL}$), corroborando que esse composto é o componente ativo da F4a.

O efeito inibitório dos metabólitos secundários da cepa LV de *P. aeruginosa* em biofilmes fúngicos tem sido pouco explorado. Como mencionamos anteriormente, F4a inibiu

os biofilmes maduros (24 horas) de *C. auris*, exibindo efeito inibitório dose-dependente na viabilidade das células sésseis. A CIM capaz de reduzir 50% das contagens de UFC (SCIM₅₀) foi de 32,94 $\mu\text{g/mL}$ e de 47,02 $\mu\text{g/mL}$ para *C. auris* CBS 10913 e *C. auris* CBS 12766, respectivamente (Spoladori et al., 2023). Comparados aos valores de SCIM₅₀ para *C. albicans* (variando de 3,12 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$), essa espécie parece ser mais suscetível à F4a.

Figura 5

Atividade antibiofilme de F4a em biofilmes de *Candida albicans*.



Fonte: Os autores.

Nota. Biofilmes de 24 horas formados na superfície de poliestireno foram tratados com diferentes concentrações de F4a por 24 horas, a 37 °C. A viabilidade das células sésseis foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os valores representados são média \pm desvio-padrão de dois experimentos em quintuplicata. Os asteriscos indicam redução significativa de células sésseis metabolicamente ativas e tratadas com F4a, em comparação com as células não tratadas. * $p < 0,01$.

A F4a e a fluopsina C são tóxicas para as células HeLa

O efeito de F4a e de fluopsina C em células de adenocarcinoma de colo uterino (HeLa) foi determinado após 24 horas de tratamento. Os valores de CC₅₀ calculados (a concentração citotóxica mais baixa para 50% das células) foram de 0,86 $\mu\text{g/mL}$ e de 0,43 $\mu\text{g/mL}$ para F4a e para fluopsina C, respectivamente. Os valores de CC₅₀ foram inferiores aos valores de CIM e de SCIM para *C. albicans* neste estudo, indicando maior toxicidade para células mamíferas. De fato, estudos anteriores relataram atividade antitumoral dependente do tempo e da dose de fluopsina C em células HeLa (Otsuka et al., 1971) e em células de adenocarcinoma humano de mama (Ma et al., 2013; Lima et al., 2022).

Especificamente, na linhagem celular MCF-7, a fluopsina C induziu danos à membrana celular, desorganização do citoesqueleto e acumulação de espécies reativas de oxigênio, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e do nível intracelular de ATP (Ma et al., 2013). Além disso, induziu a parada da divisão celular na fase G1, danos ao DNA e estresse reticular (Lima et al., 2022).

Estudos anteriores também relataram a toxicidade da F4a e da fluopsina C em linhagens celulares primárias, em condições *in vitro*. A CC₅₀ de F4a (Bartolomeu-Gonçalves et al., 2022) e de fluopsina C (Navarro et al., 2019) para células LLC-MK2 (células epiteliais renais de *Macaca mulatta*) foi igual a 3,44 $\mu\text{g/mL}$ e a 2,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses valores também foram inferiores aos valores de CIM e de SCIM para *C. albicans*. Ademais, Ma et al. (2013) relataram a toxicidade da fluopsina C para hepatócitos humanos (HL7702) e para células epiteliais mamárias (HMLE). Por fim, uma DL₅₀ (dose letal capaz de matar 50% dos camundongos) em torno de 3,0 a 6,0 mg/kg via intraperitoneal (Egawa et al., 1970) e de 4,0 mg/kg via intravenosa (Navarro et al., 2019) foi identificada.

CONCLUSÃO

Neste estudo, pela primeira vez, relatamos a atividade antifúngica de F4a obtida da cepa LV de *P. aeruginosa* em células planctônicas e sésseis de *C. albicans*, exibindo diferentes genótipos e sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol. Os resultados indicam que essa atividade está relacionada à presença de fluopsina C. Estudos adicionais são necessários, com o objetivo de: a) reduzir a toxicidade para células de mamíferos, por meio da modificação da estrutura química dos componentes ativos de F4a ou do uso de sistemas de liberação de medicamentos; b) avaliar o efeito combinado de F4a e seus componentes ativos com outros compostos antifúngicos, na tentativa de reduzir os valores de CIM.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LAMM-UUEL), bem como ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM), pelo apoio fornecido nas técnicas de microscopia; ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, Brasil, por gentilmente doar as cepas de referência de *C. albicans* e de *C. parapsilosis*. C.L.M., G.B.G., G.S.R. e A.S.S. foram financiados por bolsa de pós-graduação da CAPES. C.V.K., G.A. e S.F.Y.O. (CNPq 309260/2022-1) foram financiados por uma bolsa de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram a ausência de conflito de interesse.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 01).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Conceitualização: C. L. M., G. A., S. F. Y. O. *Análise de dados:* E. R. T., C. L. M. *Recebimento de financiamento:* G. A., L. M. Y., S. F. Y. O. *Pesquisa:* C. L. M., G. B. G., G. S. R., A. S. S., E. R. T. *Metodologia:* G. A., E. R. T., L. M. Y., S. F. Y. O. *Administração do projeto:* G. A., S. F. Y. O. *Disponibilização de ferramentas:* C. V. N., M. V. P. R. *Supervisão:* S. F. Y. O. *Validação de dados e de experimentos:* C. L. M., G. B. G., G. S. R., A. S. S., C. V. N., M. V. P. R., G. A., E. R. T., L. M. Y., S. F. Y. O. *Design da apresentação de dados:* C. L. M., G. B. G., S. F. Y. O. *Redação do rascunho inicial:* C. L. M., S. F. Y. O. *Revisão e edição da escrita:* C. L. M., G. B. G., G. S. R., A. S. S., C. V. N., M. V. P. R., G. A., E. R. T., L. M. Y., S. F. Y. O.

REVISÃO POR PARES

A Revista Uningá agradece aos revisores anônimos por sua contribuição para a revisão por pares deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Afonso, L., Andreato, M. F. D. L., Chryssafidis, A. L., Alarcon, S. F., Neves, A. P., Silva, J. V. F. R., & Andrade, G. (2022). Fluopsin C: a review of the antimicrobial activity against Phytopathogens. *Agronomy*, 12(12), p. 2997. doi: 10.3390/agronomy12122997

Atienza-Carrera, M. B., Cabezas-Mera, F. S., Tejera, E., & Machado, A. (2022). Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: a meta-analysis. *PLoS One*, 17(2), p. e0263522. doi: 10.1371/journal.pone.0263522

Bansal, H., Singla, R. K., Behzad, S., Chopra, H., Grewal, A. S., & Shen, B. (2021). Unleashing the potential of microbial natural products in drug discovery: focusing on streptomyces as antimicrobials goldmine. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 21(26), pp. 2374-2396. doi: 10.2174/1568026621666210916170110

Barry, L. A., Craig, W. A., Nadler, H., Reller, L. B., Sanders, C. C., & Swenson, J. M. (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline*. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Bartolomeu-Gonçalves, G., Moreira, C. L., Andriani, G. M., Simionato, A. S., Nakamura, C. V., Andrade, G., & Yamada-Ogatta, S. F. (2022). Secondary metabolite from *Pseudomonas aeruginosa* LV strain exhibits antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*: Metabolito secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV exibe atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Development*, 8(10), pp. 67414-67435. doi: 10.34117/bjdv8n10-170

Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., & Andrade, G. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, pp. 545-556. doi: 10.1016/j.cbab.2018.12.024

Bizerra, F. C., Nakamura, C. V., Poersch, C., Svidzinski, T. I. E., Quesada, R. M. B., Goldenberg, S., & Yamada-Ogatta, S. F. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research*, 8(3), pp. 442-450. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x

Bretagne, S., Sitbon, K., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Letscher-Bru, V., Cassaing, S., & French Mycoses Study Group. (2022). Active surveillance program to increase awareness on invasive fungal diseases: the French RESSIF network (2012 to 2018). *Mbio*, 13(3), pp. e00920-22. doi: 10.1128/mbio.00920-22

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. 4th ed. CLSI Standard M60. Wayne, PA, USA: CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). *Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts*. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. Wayne, PA, USA: CLSI.

Del Rio, L. A., Gorgé, J. L., Olivares, J., & Mayor, F. (1972). Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora* II. Isolation, purification, and properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(3), pp. 189-194. doi: 10.1128/AAC.2.3.189

Egawa, Y., Umino, K., Awataguchi, S., Kawano, Y., & Okuda, T. (1970). Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. I. Production, isolation and properties. *The Journal of Antibiotics*, 23(6), pp. 267-70. doi: 10.7164/antibiotics.23.267

Egawa, Y., Umino, K., Ito, Y., & Okuda, T. (1971). Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. II. Structure and synthesis of thioformin and its cupric complex (YC 73). *The Journal of Antibiotics*, 24(2), pp. 124-130. doi: 10.7164/antibiotics.24.124

Eldesouky, H. E., Mayhoub, A., Hazbun, T. R., & Seleem, M. N. (2018). Reversal of azole resistance in *Candida albicans* by sulfa antibacterial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(3), pp. e00701-17. doi: 10.1128/AAC.00701-17

Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, 161(7), pp. 534-540. doi: 10.1016/j.resmic.2010.05.002

Fan, F., Liu, Y., Liu, Y., Lv, R., Sun, W., Ding, W., & Qu, W. (2022). *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(5-6), p. 106673. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106673

Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, 26(11), pp. 1408-1446. doi: 10.1039/b817075b

Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16(1), pp. 1-8. doi: 10.1186/s12859-015-0703-0

Itoh, S., Inuzuka, K., & Suzuki, T. (1970). New antibiotics produced by bacteria grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). *The Journal of Antibiotics*, 23(11), pp. 542-545. doi: 10.7164/antibiotics.23.542

Kerbaui, G., Vivan, A. C., Simões, G. C., Simionato, A. S., Pelisson, M., Vespero, E. C., & Andrade, G. (2016). Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(4), pp. 389-97. doi: 10.2174/138920101704160215171649

Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J., & Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of Clinical Pathology*, 52(5), p. 385. doi: 10.1136/jcp.52.5.385

Klepser, M. E., Ernst, E. J., Lewis, R. E., Ernst, M. E., & Pfaller, M. A. (1998). Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(5), pp. 1207-1212. doi: 10.1128/AAC.42.5.1207

Lima, L. V. A., Silva, M. F., Concato, V. M., Rondina, D. B. L., Zanetti, T. A., Felicidade, I., & Mantovani, M. S. (2022). DNA damage and reticular stress in cytotoxicity and oncotic cell death of MCF-7 cells treated with fluopsin C. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 85(21), pp. 896-911. doi: 10.1080/15287394.2022.2108950

Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), pp. 89-121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950

Ma, L. S., Jiang, C. Y., Cui, M., Lu, R., Liu, S. S., Zheng, B. B., & Li, X. (2013). Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(8), pp. 1093-100. doi: 10.1038/aps.2013.44

Morey, A. T., Souza, F. C., Santos, J. P., Pereira, C. A., Cardoso, J. D., Almeida, R. S. de., & Yamada-Ogatta, S. F. (2016). Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(4), pp. 365-75. doi: 10.2174/1389201017666151223123712

Moyes, D. L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., & Naglik, J. R. (2010). A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host & Microbe*, 8(3), pp. 225-235. doi: 10.1016/j.chom.2010.08.002

Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Pérez, J. C. B., Barazetti, A. R., Emiliano, J., Niekawa, E. T. G., & Andrade, G. (2019). Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: *in vitro* activity against clinically important strains and *in vivo* efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 2431. doi: 10.3389/fmicb.2019.02431

Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2), pp. 96-108. doi: 10.1038/nrmicro.2016.157

Noumi, E., Snoussi, M., Saghrouni, F., Ben Said, M., Del Castillo, L., Valentin, E., & Bakhrouf, A. (2009). Molecular typing of clinical *Candida* strains using random amplified polymorphic DNA and contour-clamped homogenous electric fields electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), pp. 1991-2000. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04384.x

Otsuka, H., Niwayama, S., Tanaka, H., Take, T., & Uchiyama, T. (1971). An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of *Pseudomonas* origin. *The Journal of Antibiotics*, 25(6), pp. 369-70. doi: 10.7164/antibiotics.25.369

Patel, M. (2022). Oral cavity and *Candida albicans*: colonisation to the development of infection. *Pathogens*, 11(3), p. 335. doi: 10.3390/pathogens11030335

Patteson, J. B., Putz, A. T., Tao, L., Simke, W. C., Bryant III, L. H., Britt, R. D., & Li, B. (2021). Biosynthesis of fluopsin C, a copper-containing antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 374(6570), pp. 1005-1009. doi: 10.1126/science.abj6749

Salvatori, O., Kumar, R., Metcalfe, S., Vickerman, M., Kay, J. G., & Edgerton, M. (2020). Bacteria modify *Candida albicans* hypha formation, microcolony properties, and survival within macrophages. *mSphere*, 5(4), p. e00689-20. doi: 10.1128/mSphere.00689-20

Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. (2003). Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic Cell*, 2(5), pp. 1053-1060. doi: 10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003

Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., & Foroumadi, A. (2020). History of the development of antifungal azoles: a review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104, p. 104240.

Sharifi, M., Badiie, P., Abastabar, M., Morovati, H., Haghani, I., Noorbakhsh, M., & Mohammadi, R. (2023). A 3-year study of *Candida* infections among patients with malignancy: etiologic agents and antifungal susceptibility profile. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, p. 555. doi: 10.3389/fcimb.2023.1152552

Spoladori, L. F. D. A., Andriani, G. M., Castro, I. M. D., Suzukawa, H. T., Gimenes, A. C. R., Bartolomeu-Gonçalves, G., & Yamada-Ogatta, S. F. (2023). Synergistic antifungal interaction between *Pseudomonas aeruginosa* LV strain metabolites and biogenic silver nanoparticles against *Candida auris*. *Antibiotics*, 12(5), p. 861. doi: 10.3390/antibiotics12050861

Ward, T. L., Dominguez-Bello, M. G., Heisel, T., Al-Ghalith, G., Knights, D., & Gale, C. A. (2018). Development of the human mycobiome over the first month of life and across body sites. *mSystems*, 3(3), pp. 10-1128. doi: 10.1128/mSystems.00140-17

World Health Organization. (2022). *Fungal priority pathogens list to guide research, development and Public Health action*. World Health Organization: Geneva, Switzerland. Retrieved from <https://www.who.int/publications/item/9789240060241>