

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

ADRIANA LEAL ROSSI

EFEITO DA ERITROSINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA EM *Candida albicans*

São Paulo, SP

2021



ADRIANA LEAL ROSSI

**EFEITO DA ERITROSINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA EM *Candida albicans***

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Doutora em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2021

Rossi, Adriana Leal.

Efeito da eritrosina na terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Candida albicans*. / Adriana Leal Rossi.

38 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

Candida albicans. 2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 3. Eritrosina. 4. LED. 5. Microscopia de fluorescência. 6. quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT)

I. Prates, Renato Araujo. II. Título.

CDU 615.8

São Paulo, 14 de outubro de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Adriana Leal Rossi

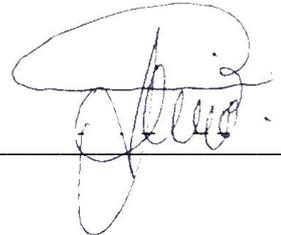
Título da Tese: "Efeito da eritorsina na terapia fotodinâmica antimicrobiana em cândida albicans".



Presidente: PROF. DR. RENATO ARAÚJO PRATES _____



Membro: PROF^a. DR^a. LARA JANSISKI MOTTA _____



Membro: PROF^a. DR^a ALESSANDRA BAPTISTA _____



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS _____



Membro: PROF^a. DR^a. MARCELA LETÍCIA GONÇALVES LEAL _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Renato e Lucia, por todo incentivo e apoio ao longo de toda minha carreira profissional.

Às minhas irmãs, Bianca e Camila, por todo carinho e companheirismo.

Aos meus filhos, Sophia e Arthur, cuja existência é o estímulo para seguir adiante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores do Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, por todo ensinamento e paciência ao longo deste trabalho.

Ao meu orientador, Renato Araujo Prates, pela condução dedicada e incentivo constante na confecção deste trabalho.

À minha amiga irmã, Kátia Lumi Tanikawa Vergílio, por todo companheirismo, incentivo e ajuda, durante esses 27 anos de amizade.

RESUMO

A *Candida albicans* (*C. albicans*) é um fungo dimórfico pseudofilamentar, que pode sobreviver e infectar humanos com difícil resolução por terapia antifúngica. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) gera espécies reativas de oxigênio com potencial para eliminação de micro-organismos. O corante eritrosina tem potencial fotodinâmico e pode ter ação em micro-organismos orais, portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da aPDT mediada por eritrosina e luz azul em *Candida albicans*. Foi avaliado o tempo de morte celular e a incorporação da eritrosina dentro da célula fúngica. Para a execução do presente trabalho foi selecionada a cepa *Candida albicans* ATCC 90028 devidamente preparada para o ensaio de irradiação. A irradiação foi realizada com um equipamento LED fotopolimerizador odontológico (DMC, São Carlos, SP, Brasil), emitindo comprimento de onda em $\lambda = 430 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$ e uma potência radiante de 1000 mW. As amostras foram irradiadas do topo de uma placa de microtitulação de 24 poços com irradiância de $I = 500 \text{ mW} / \text{cm}^2$ e exposição radiante de 0 a 377 J/cm^2 , com tempos de irradiação variando de 0 a 720 s. O fotossensibilizador utilizado foi a Eritrosina em concentrações de 100 μM . As suspensões de leveduras foram divididas em grupos: Controle sem irradiação e fotossensibilizador (L-FS-), grupo irradiado sem fotossensibilizador (L+720FS-), grupo fotossensibilizador sem irradiação (L-FS+), e os grupos que receberam fotossensibilizador e irradiação chamados grupos aPDT e descritos pela sigla L+ seguido do tempo de irradiação em segundos e FS+. Para avaliar a absorção e incorporação da eritrosina foi realizada a microscopia de fluorescência e a espectroscopia de absorção óptica. A eritrosina apresentou erradicação dos micro-organismos testados com total inativação após 120 s de irradiação e foi observado incorporação de fotossensibilizador dentro do fungo. A aPDT mediada por eritrosina e luz azul foi efetiva na inativação de *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*, terapia fotodinâmica antimicrobiana, eritrosina, LED, microscopia de fluorescência, quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT)

ABSTRACT

Candida albicans (*C. albicans*) is a pseudofilamentous dimorphic fungus that can survive and infect humans with difficult resolution by antifungal therapy. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) generates reactive oxygen species with the potential to kill microorganisms. The erythrosine dye has photodynamic potential and can act on oral microorganisms; therefore, the aim of this work was to investigate the effect of erythrosine-mediated aPDT and blue light on *Candida albicans*. The cell death time and the incorporation of erythrosine into the fungal cell were evaluated. For the execution of this work, the *Candida albicans* ATCC 90028 strain was selected, properly prepared for the irradiation test. Irradiation was carried out with a LED dental light-curing device (DMC, São Carlos, SP, Brazil), emitting a wavelength at $\lambda = 430 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$ and a radiant power of 1000 mW. The samples were irradiated from the top of a 24-well microtiter plate with an irradiance of $I = 500 \text{ mW} / \text{cm}^2$ and radiant exposure of 0 to 377 J/cm², with irradiation times ranging from 0 to 720 s. The photosensitizer used was Erythrosine at concentrations of 100 μM . Yeast suspensions were divided into groups: Control without irradiation and photosensitizer (L-FS-), irradiated group without photosensitizer (L+720FS-), photosensitizer group without irradiation (L-FS+), and groups that received photosensitizer and irradiation called aPDT groups and described by the acronym L+ followed by the irradiation time in seconds and FS+. To assess the absorption and incorporation of erythrosine, fluorescence microscopy and optical absorption spectroscopy were performed. Erythrosine eradicated the tested microorganisms with total inactivation after 120 s of irradiation and incorporation of photosensitizer into the fungus was observed. APDT mediated by erythrosine and blue light was effective in inactivating *Candida albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, antimicrobial photodynamic therapy, erythrosin, LED, fluorescence microscopy, photodynamic antimicrobial chemotherapy PACT

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Molécul ar do corante Eritrosina B. Fonte: Jesus, G. J. de et al. Biodegradation of Erythrosin B Dye by Paramorphic Neurospora crassa 74A Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.2: pp. 473-480, Mar/Apr 2010.....	18
Figura 2 - Espectros de absorção UV-Vis do corante Eritrosina B, no intervalo 350-800nm. Fonte: Jesus, G. J. de et al. Biodegradation of Erythrosin B Dye by Paramorphic Neurospora crassa 74A Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.2: pp. 473-480, Mar/Apr 2010	19
Figura 3 - As amostras foram irradiadas em uma placa de titulação de 24 poços com equipamento LED (Light emitted diode) (DMC, São Carlos, SP, Brasil) ..	23
Figura 4 – Resultados da Média obtida por grupo. Os dados são as médias e desvio padrão de log ¹⁰ (UFC/mL). Os 3 primeiros grupos são considerados controles do experimento.	27
Figura 5- Microscopia de Fluorescência de células de C. albicans coradas com 100 µM de eritrosina.5A- Controle: Células de C. albicans não coradas com eritrosina. 5B- células de C. albicans coradas com 100 µM de eritrosina	27
Figura 6 – Espectro de absorção da eritrosina na concentração de 100 µM em água destilada e deionizada.	28
Figura 7 – Leitura de absorbância em 528 nm das amostras de eritrosina a 100 µM e do sobrenadante da C. albicans corada com eritrosina e posteriormente lavada e digerida em NaOH e SDS 1%.	29

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Dosimetria da fonte de luz LED utilizada nos experimentos	23
Tabela 2 - Resultados médios obtidos por grupo. Resultados em Log ¹⁰ (UFC/mL).....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CI – Candidíase Invasiva

PAI – Pneumonia Associada a Intubação

PDT – Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy*)

aPDT – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy*)

PACT – Quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*)

MB – Azul de Metileno (do inglês *Methylene Blue*)

TBO – Azul de Orto Toluidina (do inglês *Toluidine Blue Ortho*)

FS – Fotossensibilizador

MG – Verde Malaquita (do inglês *malachite green*)

RB – Rosa Bengala (do inglês *rose bengal*)

EOS – Eosina

ERI – Eritrosina

RPM – Rotação por minuto

pH – Potencial Hidrogeniônico

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

LED – Diodo emissor de luz (do inglês *Light Emitted Diode*)

LISTA DE SINAIS E SÍMBOLOS

°C – Graus Centígrados

% - Porcentagem

< - Menor

B – Beta

Sumário

Sumário	12
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1 <i>Candida albicans</i>	13
1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)	15
1.3. Eritrosina	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Gerais	21
2.2 Específicos	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 Preparação do Inóculo	22
3.2 Irradiação e Parâmetros	22
3.3 Preparação do Fotossensibilizador	23
3.4. Ensaio de Sobrevivência Microbiana.....	24
3.5 Microscopia de fluorescência	24
3.6 Espectroscopia de absorção óptica e incorporação de fotossensibilizador.....	25
3.7 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS	26
Microscopia de fluorescência	27
Incorporação de fotossensibilizador	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 *Candida albicans*

A *Candida albicans* (*C. albicans*) é um fungo dimórfico pseudofilamentar, que pode sobreviver em humanos como patógeno comensal e oportunista, podendo apresentar-se como leveduras esféricas ou na forma alongada, denominada "hifa". Ambas são capazes de causar a candidíase bucal, embora sejam encontradas juntas e cada forma possa estar associada com saúde ou doença. Nos estágios iniciais da infecção, a formação de hifas pode promover a aderência e a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro. É frequentemente responsável pela gênese da candidíase invasiva (CI), que pode se manifestar de várias formas tais como candidemia, candidíase disseminada, endocardite, meningite e candidíase oral¹.

A detecção de fungos entre outros organismos comensais de biofilmes bacterianos significou um avanço no conhecimento da biologia oral². De fato, patógenos fúngicos podem causar sérios problemas de saúde para humanos, no entanto, esse assunto foi anteriormente desconsiderado³. Estima-se que as infecções por fungos sejam responsáveis por mais de um milhão de mortes humanas por ano, atribuídas a fungos pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Aspergillus* ou *Candida*⁴.

Recentemente, a incidência da candidíase invasiva aumentou progressivamente e essa tendência está associada a um aumento da resistência de *C. albicans* aos medicamentos antifúngicos mais comuns, como anfotericina B, nistatina, clotrimazol e fluconazol^{5,6}.

Uma possível razão é que *C. albicans* forma comunidades microbianas ligadas à superfície conhecidas como biofilmes que lhes confere uma maior resistência a ação dos antifúngicos convencionais⁷⁻⁹. De fato, as células maduras, hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* formam uma estrutura tridimensional, chamada de substância polimérica extracelular contendo β -1,3-glucano, que desempenha um papel protetor contra o sistema imunológico e medicamentos antifúngicos¹⁰.

As espécies de *Candida* são classificadas e definidas como patógenos oportunistas, estão bem adaptados ao corpo humano e são capazes de colonizá-lo sem produzir sinais de doenças. Habitam a cavidade bucal humana como comensais entre 40% e 60% da população dependendo do grupo estudado¹¹.

Candidemia, ou infecção da corrente sanguínea causada por espécies de *Candida*, é uma subclassificação da candidíase invasiva (CI) com incidência aumentada nas últimas décadas, considerada uma doença persistente, problema de saúde pública com grande impacto nos custos associados aos cuidados de saúde e alto valor bruto (35% a 75%) e mortalidade atribuível, apesar dos avanços alcançados no diagnóstico e tratamento¹.

As espécies de *Candida* são geralmente referidas como a quarta causa principal de Pneumonia Associada a Intubação (PAI) nosocomial, responsável por 8 a 10% de todas as PAIs adquiridas em hospitais¹. Recentemente, um estudo abrangendo vários estados dos EUA relatou *Candida sp.* como os patógenos mais prevalentes obtidos de PAIs nosocomiais, superando até mesmo algumas espécies bacterianas comuns⁷.

Pelo menos 15 diferentes *Candida spp.* foram relatados como causadores de infecções invasivas em humanos. No entanto, mais de 90% deles são causados por cinco espécies principais, a saber: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*^{2, 3, 8,9}.

As infecções causadas pelo gênero *Candida sp.* na cavidade bucal, são definidas como Candidíase bucal. São reconhecidas quatro variações clinicamente distintas: candidíase aguda eritematosa, pseudomembranosa, eritematosa crônica e candidíase hiperplásica crônica¹².

A patogenicidade de *C. albicans* também está associada à sua virulência, ou seja, a diversos fatores inerentes ao próprio fungo que agem concomitantemente a fim de superar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Fatores como a capacidade de aderência às células epiteliais, ao dimorfismo, a sua variada capacidade de crescimento (blastoporos, pseudo-hifas e hifas), a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lisofosfolipases), produção de endotoxinas e a configuração de sua parede celular¹³.

A capacidade da *C. albicans* de mudar de levedura para estágios hifais e de formação de biofilme com estrutura complexa, os tornam resistentes à maioria dos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, incluindo anfotericina B e fluconazol e parecem ter múltiplos mecanismos resistentes. É um dos dez micro-organismos frequentes isolados de pacientes com infecções da corrente sanguínea e o quarto lugar em causar infecções nosocomias com taxa de mortalidade de 40%. Assim, o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos mais eficazes é essencial e cruciais neste momento¹⁴. Os antibióticos emergentes são mais potentes, mas exaltam o risco de toxicidade sistêmica. Assim, a necessidade urgente de uma estratégia alternativa é essencial para a sobrevivência¹⁴.

1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

A terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy* (PDT) é um tratamento estabelecido para inativação de células tumorais localizadas, envolvendo a aplicação e retenção de um agente fotossensibilizador aplicado em tecidos neoplásicos. Após a irradiação com luz de comprimento de onda apropriado, o fotossensibilizador passa por uma transição de um "estado fundamental" de baixa energia para um "estado tripleto" de alta energia. Este fotossensibilizador de estado tripleto pode reagir com biomoléculas para produzir radicais livres e íons radicais, ou com oxigênio molecular para produzir oxigênio singleto. Estes efeitos citotóxicos podem causar oxidação de constituintes celulares, como citoplasma, membranas e DNA, resultando em morte celular.¹ Esta mesma abordagem fotodinâmica também pode ser usada para matar micro-organismos^{7,8,9}.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), também conhecida como PACT (do inglês *photodynamic antimicrobial chemotherapy*), foi proposta como uma abordagem alternativa promissora para o tratamento de biofilmes orais^{13,15}.

aPDT é uma combinação de um fotossensibilizador, luz em comprimento de onda específico e oxigênio é uma modalidade minimamente invasiva para tratar uma ampla variedade de distúrbios. Na odontologia, as propriedades antibacterianas e antifúngicas de alguns agentes corantes têm sido utilizadas para obter resultados melhores no tratamento do canal radicular, na terapia

periodontal e na erradicação da candidíase na prótese¹⁶⁻¹⁸. No entanto, os fotossensibilizadores mais utilizados como o azul de metileno (MB) e o azul de orto toluidina (TBO) mostraram eficácia limitada contra *C. albicans* em infecções da mucosa oral, especialmente em formas de biofilme¹⁹⁻²².

Este resultado pode estar relacionado à captação do fotossensibilizador (FS) afetado pelos sistemas de efluxo da membrana plasmática das células fúngicas, interrompendo a inativação celular por aPDT²³.

Uma das classes de fotossensibilizadores mais utilizadas na odontologia é a das fenotiazinas, são corantes azuis, e dentre eles estão o azul de metileno e o azul de toluidina. Estas são moléculas tricíclicas planas que apresentam um átomo de nitrogênio quaternário com eficiente fototoxicidade contra diversos micro-organismos^{7,10}.

Outros estudos sugerem que o dano celular que ocorre após o tratamento com aPDT pode ser resultado da interferência com a membrana citoplasmática, que aumenta a permeabilidade, causando danos ao sistema intracelular que tem como alvo e reduz a formação de tubos germinativos²⁴⁻²⁶.

A eficácia da aPDT é dependente sobre vários fatores, como o comprimento de onda e sua interação com o fotossensibilizador, a potência de saída, a duração do tempo de irradiação, o diâmetro do feixe, o modo de operação da luz fonte (contínua ou pulsada) e a convergência do feixe (focado ou desfocado)¹¹.

É importante ressaltar que a toxicidade celular somente ocorre quando o espectro de absorção do FS e a radiação emitida são compatíveis. O comprimento de onda e intensidade da luz, o tempo de exposição e a capacidade de absorção do FS determinam os resultados.

Fontes de luz vermelha (630-700 nm) têm sido amplamente utilizadas em aPDT devido aos seus comprimentos de onda relativamente longos, que podem efetivamente penetrar nos tecidos biológicos¹⁹. Os relatórios da literatura científica mostram que a interação entre essas fontes de luz e os fotossensibilizadores que absorvem neste comprimento de onda, como o azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO) e verde malaquita (MG), pode resultar em

morte microbiana significativa ¹⁵⁻¹⁸. Além disso, pesquisas também mostraram que a luz azul (380-520 nm) é uma opção atraente para aPDT, porque as fontes de luz azul podem ser usadas em combinação com outros fotossensibilizadores, como a rosa bengala (RB), eosina (EOS) e eritrosina (ERI), para fotoinativar micro-organismos orais ^{20,21}.

O uso de equipamentos convencionais para fotopolimerização de resinas em consultório odontológico foi demonstrado, primeiramente por Young-Ho Lee²⁷. Os autores avaliaram os efeitos do aPDT de uma combinação de eritrosina e uma unidade fotopolimerizadora halogéna padrão, de uso odontológico, na viabilidade de *S. mutans* na fase de biofilme.

Os autores demonstraram uma diminuição significativa no biofilme *in vitro* *S. mutans* em resposta a esta simples técnica de aPDT e concluíram que o fotossensibilizador e fonte de luz usados, eritrosina e uma unidade de fotopolimerização de luz halogéna, comumente usados em clínicas odontológicas, permite obter o efeito aPDT na maioria das clínicas sem custos adicionais.

Lasers e diodos emissores de luz (LEDs) de diferentes comprimentos de onda foram testados, incluindo ensaios clínicos, especialmente na odontologia^{28,29}. Nesta área específica, o uso de corantes vermelhos associados com LEDs azuis torna a terapia mais acessível, pois a maioria dos dentistas já tem essa fonte de luz em seus consultórios³⁰.

Costa et al. (2011)³¹ observaram que a eritrosina era mais eficaz do que a rosa bengala contra cepas de *C. albicans* em culturas planctônicas; no entanto, não logrou explicar as interações desses fotossensibilizadores com células de levedura por tratar-se do primeiro trabalho utilizando estes fotossensibilizadores e por não encontrar na literatura, o que poderia esclarecer estes resultados.

1.3. Eritrosina

A eritrosina é um corante vermelho que foi aprovado pela FDA para uso em alimentos/produtos alimentícios e já foi aprovado para uso em odontologia.

A eritrosina tem sido usada nas últimas décadas como um evidenciador de placa na forma de solução ou comprimidos mastigáveis.

Ela pertence a uma classe de compostos cíclicos chamados xantenos, que absorvem luz do espectro visível, e sua capacidade de iniciar reações fotoquímicas é bem documentada.³² A eficácia da eritrosina na sensibilização de micro-organismos não bucais associada a aPDT está igualmente bem estabelecida.^{33,34}

Apesar deste uso seguro, como evidenciador do biofilme dental, poucos trabalhos enfocam seu uso como fotossensibilizador na boca³⁴.

Foram realizados testes, nos quais este fotossensibilizador foi utilizado contra células cancerígenas³⁵, bem como para micro-organismos como *Streptococcus mutans*²², *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*³⁶. Em dois destes estudos, os LEDs de uso odontológico foram utilizados como fontes de luz²². O uso deste corante combinado com LEDs também foi testado in vitro^{37,38} e em estudos com camundongos^{39,40} contra *Candida albicans*.

A eritrosina é um corante de xanteno que tem como característica a absorção máxima de luz em comprimentos de onda 500–550 nm; esta absorção está associada a consequentes reações fotoquímicas.^{24,25} O corante eritrosina (Figura 1) é um evidenciador de biofilme que normalmente é utilizado em concentrações de 9 a 25 mM. A eritrosina em particular é ideal para uso em aPDT em comparação com outros corantes pois tem aprovação para uso na cavidade oral e não apresenta toxicidade direta para o paciente.^{24,35}

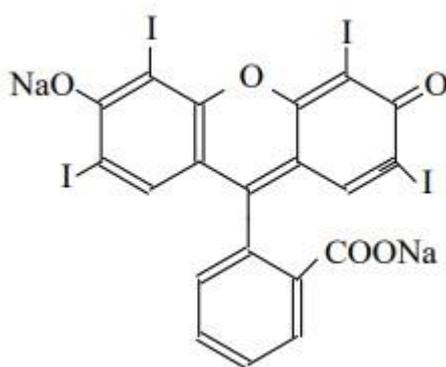


Figura 1 - Estrutura Molécul do corante Eritrosina B. Fonte: Jesus, G. J. de et al. Biodegradation of Erythrosin B Dye by Paramorphic *Neurospora crassa* 74A Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.2: pp. 473-480, Mar/Apr 2010

Os corantes xantenos já foram usados em aPDT com fotopolimerizadores na concentração de 22 µM e irradiado com lâmpada de filamento de tungstênio

com emissão máxima entre 500 e 550 nm (Figura 2) e outras fontes de luz não coerentes para a redução de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras; no entanto, o uso desses corantes para aPDT usando uma fonte de luz LED ainda é pouco avaliada.^{24-26,34}

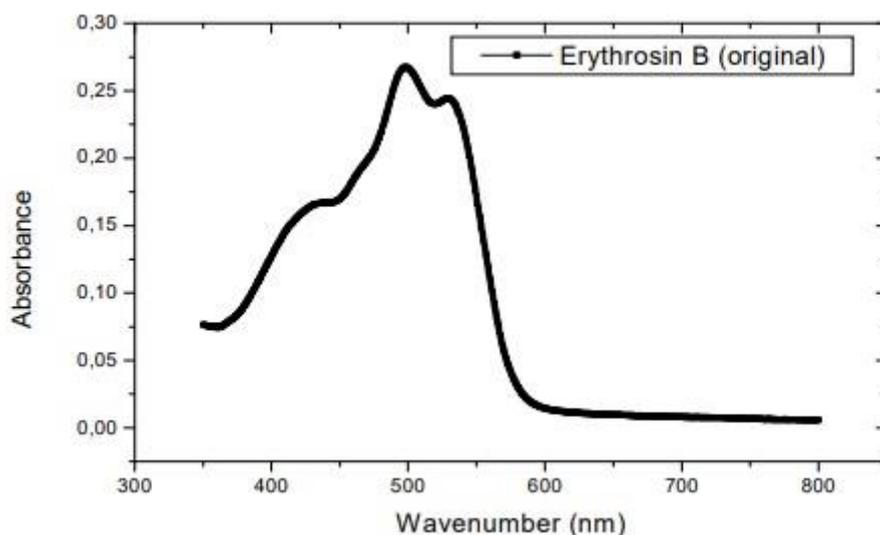


Figura 2 - Espectros de absorção UV-Vis do corante Eritrosina B, no intervalo 350-800nm.
Fonte: Jesus, G. J. de et al. Biodegradation of Erythrosin B Dye by Paramorphic Neurospora crassa 74A Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n.2: pp. 473-480, Mar/Apr 2010

Gong et al.⁴¹ em um trabalho publicado em 2019, demonstrou que a aPDT mediada por eritrosina mostrou um efeito significativo de morte microbiana em um biofilme cariogênico multiespécies composto por *S. mutans*, *L. casei* e *C. albicans*. Este resultado foi consistente com estudos anteriores que avaliaram o efeito da aPDT mediada por eritrosina em biofilmes de *S. mutans* ou *C. albicans* sozinho.^{6,17}

Em um estudo realizado por Costa et al.³¹ (2011), os autores relataram uma inibição significativa em biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* durante o tratamento aPDT com eritrosina 40 µM.

Choi et al.⁴² em seu estudo, demonstraram que a concentração entre 20-40 µM de eritrosina na aPDT em biofilme de *S. mutans* apresentou melhores resultados. Faixa de concentração similar deste corante é frequentemente utilizada em aplicações clínicas odontológicas como agentes reveladores de biofilme dentário.

Desta forma, mais estudos são necessários para investigar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Candida albicans* mediada por eritrosina.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito antimicrobiano do fotossensibilizador eritrosina em *Candida albicans*.

2.2 Específicos

- Investigar a capacidade de inativação microbiana em função do tempo de irradiação com LED azul em *Candida albicans*;
- Avaliar a incorporação da eritrosina em *Candida albicans*;
- Investigar a localização intracelular de eritrosina em *Candida albicans*.

METODOLOGIA

Para a execução do presente trabalho foi selecionada a cepa *Candida albicans* ATCC 90028. O fungo permanece armazenado nos estoques microbiológicos sob refrigeração de -80°C, no laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, UNINOVE, São Paulo, Brasil. As leveduras foram descongeladas e cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose, incubadas a 37°C por 24h em atmosfera com oxigênio.

3.1 Preparação do Inóculo

Subsequente ao descongelamento e crescimento em ágar Sabouraud, duas colônias foram isoladas e colocadas para crescimento em caldo Sabouraud por 24h em atmosfera aeróbica a 37 °C em tubos Falcon de 15 mL. Após esse período, o tubo Falcon foi centrifugado a 2800 rotações por minuto (RPM) e as células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada por fosfato (PBS) com pH ajustado em 7,2. O inóculo foi preparado com a suspensão em 7 mL de PBS do *pellet* de *C. albicans* formado no Falcon, com transmitância correspondente à escada 1 de McFarland, que corresponde a aproximadamente uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

3.2 Irradiação e Parâmetros

A irradiação foi realizada com um equipamento LED (*Light emitted diode*) (DMC, São Carlos, SP, Brasil) emitindo comprimento de onda a $\lambda = 430 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$ e uma potência radiante de 1000 mW (Figura 1).

As amostras foram irradiadas do topo de uma placa de microtitulação de 24 poços com irradiância de $I = 500 \text{ mW} / \text{cm}^2$ e exposição radiante de 0 a 377 J/cm², com tempos de irradiação variando de 0 a 720 s (tabela 1).

Tabela 1 - Dosimetria da fonte de luz LED utilizada nos experimentos

Parâmetros	LED
Comprimento de onda (nm)	470±30
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante (mW)	1000
Área do feixe (cm ²)	2
Irradiância (mW/cm ²)	500
Tempo de exposição (s)	0 - 720
Tempo de pré-irradiação (s)	60
Exposição radiante (J/cm ²)	0 - 377
Energia radiante (J)	0 – 720

As amostras foram irradiadas de cima para baixo em uma placa de titulação de 24 poços e alíquotas foram colhidas nos tempos de leitura (Figura 3). Cada poço foi irradiado individualmente em placa de 24 poços. A área de cultura do poço é de 1,91 cm² e os parâmetros de irradiação são apresentados na tabela 1.



Figura 3 - As amostras foram irradiadas em uma placa de titulação de 24 poços com equipamento LED (Light emitted diode) (DMC, São Carlos, SP, Brasil)

3.3 Preparação do Fotossensibilizador

Corante Eritrosina (obtido de Sigma Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA) foi usado para a sensibilização de culturas planctônicas em concentrações

de 100 μM . A concentração de fotossensibilizador para cultura planctônica foi determinada previamente em um estudo piloto.

A solução mãe de corante foi preparada por pesagem de diluição do pó de corante eritrosina em água deionizada, que posteriormente filtrados em uma membrana estéril 0,22 μm , (Milipore, SP, Brasil) e armazenado em eppendorfs protegidos de luz. A solução mãe foi preparada em concentração 100 vezes superior àquela utilizada para os testes microbiológicos.

3.4. Ensaio de Sobrevivência Microbiana

Para o ensaio microbiológico, onde foi verificado a fotoinativação do fungo, as suspensões de leveduras foram divididas nos seguintes grupos: Controle sem irradiação ou fotossensibilizador (L-FS-), grupo irradiado sem fotossensibilizador (L+720FS-), grupo fotossensibilizador sem irradiação (L-FS+), e os grupos que receberam fotossensibilizador e irradiação chamados grupos aPDT são descritos pela sigla L+ seguido do tempo de irradiação em segundos e FS+. Por exemplo: o grupo aPDT que recebeu irradiação por 2 min será chamado (L+120 FS+). O experimento foi realizado em triplicata e com pelo menos 3 repetições.

Cada grupo experimental foi quantificado em número de UFC/mL viáveis após os testes por diluição seriada em estrias com diluições de 10^{-1} até 10^{-5} vezes a concentração microbiana original.

3.5 Microscopia de fluorescência

Amostras de *C. albicans* foram crescidas em caldo Sabouraud por 48 h e depois lavadas 3 vezes em PBS 7.2 para remoção do excesso de meio de cultura. Posteriormente, elas foram divididas em 2 grupos: 1) grupo controle sem fotossensibilizador; e 2) grupo eritrosina, que ficou em contato com 100 μM de eritrosina durante 1 min. As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido com pipeta e, então, as células foram novamente lavadas 3 vezes para remoção do excesso de fotossensibilizador. Os fungos foram ressuspensos em glicerol 40% para dificultar o bombeamento e saída de

fotossensibilizador da célula, então amostras de 50 µL foram colocadas em placas de 96 poços, de fundo chato e levados para observação no microscópio de fluorescência (ZOE *fluorescente cell imager*). A imagem de fluorescência foi obtida com excitação em verde e leitura na faixa do vermelho do espectro eletromagnético. Para análise, 6 campos foram observados e fotografados.

3.6 Espectroscopia de absorção óptica e incorporação de fotossensibilizador

Para mensuração da eritrosina no interior de *C. albicans*, as células fúngicas foram crescidas em caldo Sabouraud por 48 h, depois foram lavadas 3 vezes em PBS como escrito na sessão anterior. As células foram coradas com eritrosina por 1 min e depois lavadas novamente. O *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de 0,1M NaOH e 1% Dodecil sulfato de sódio (SDS) por 48 horas. Após esse período, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante retirado para análise. Alíquotas de 100 µL foram colocadas em uma placa de 96 poços de fundo chato e sua absorção óptica foi medida no espectrofotômetro (Spectra MAX M4, Biotek, Winooski, USA). Também foi avaliada a solução de eritrosina a 100 µM sem contato prévio com células fúngicas. Nesta oportunidade, realizou-se a leitura do espectro de absorção da eritrosina na faixa de 350 a 700 nm, com intervalo de leitura de 1 nm. Esse espectro foi um teste para observar possíveis alterações da absorção da eritrosina depois de ter estado em contato com a *Candida*.

3.7 Análise Estatística

A análise microbiológica foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônias e convertida em Log¹⁰ (UFC/mL). Os dados foram submetidos à análise de normalidade Shapiro Wilk e quando considerados normais de acordo com a distribuição de dados foi adotada a apresentação de média e desvio padrão e todos os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de variância one-way (ANOVA). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey e significância de 5%, sendo considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Uma análise direta da eficácia do fotossensibilizador testado foi obtida comparando os dados de cada grupo contra o controle não tratado, e expressando morte celular como porcentagem de sobrevivência celular.

Os ensaios efetuados mostraram os seguintes resultados (Tabela 2):

Tabela 2 - Resultados médios obtidos por grupo. Resultados em Log^{10} (UFC/mL).

Grupos	Média	SD
L-FS-	6,22	0,31
L+ 720FS-	6,09	0,34
L- 0 FS+	6,28	0,27
L+ 10 FS+	6,06	0,07
L+ 20 FS+	6,10	0,12
L+ 30 FS+	5,57	0,64
L+ 60 FS+	5,04	0,30
L+ 90 FS+	4,90	0,57
L+ 120 FS+	0,00	0,00
L+ 180 FS+	0,00	0,00
L+ 360 FS+	0,00	0,00
L+ 540 FS+	0,00	0,00
L+ 720 FS+	0,00	0,00

O grupo L+720FS- (irradiado por 720s sem fotossensibilizador) mostrou um valor médio de 6.09 log^{10} UFC/ml. O grupo L-0 FS+ (grupo fotossensibilizador sem irradiação) mostrou um valor médio de 6.28 log^{10} UFC/mL (Figura 4).

Os grupos tratados com irradiação de luz LED associadas ao fotossensibilizador em tempos que variaram de 10,20 segundos não mostraram valores de diminuição significativos.

No grupo tratado com irradiação LED e fotossensibilizador por 30s uma redução microbiana pode ser observada. Esta redução se acentuou nos grupos irradiados por 60s e 90s com um 1 log^{10} UFCs/ml de redução.

Após 120s de irradiação com a adição de fotossensibilizador nenhuma célula se mostrou viável.

O gráfico abaixo expressa os resultados obtidos.

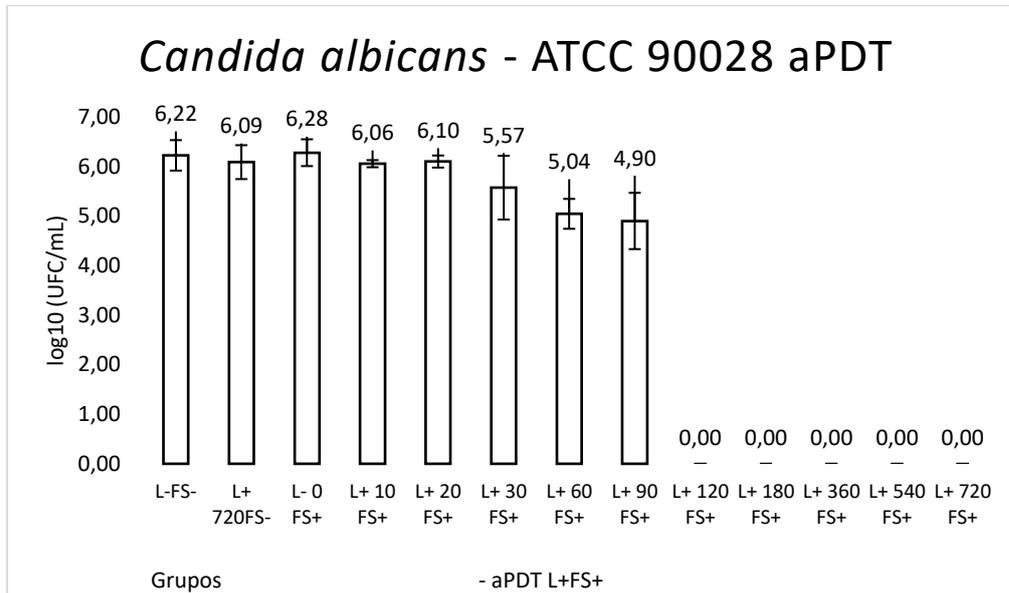


Figura 4 – Resultados da Média obtida por grupo. Os dados são as médias e desvio padrão de log¹⁰ (UFC/mL). Os 3 primeiros grupos são considerados controles do experimento.

Microscopia de fluorescência

As células de *C. albicans* coradas com 100 µM de eritrosina foram avaliadas em microscopia de fluorescência. O sinal de fluorescência foi coletado pelo canal vermelho do microscópio e os controles de fungos sem eritrosina não apresentaram imagem quando observados, apenas um campo preto denotando que as células não coradas, mesmo quando se encontravam presentes, não apresentaram sinal de fluorescência, como mostra a Figura 5 A.

Na imagem da Figura 5B, apresenta células de *C. albicans* predominantemente em formato de blastoconídeos e algumas pseudohifas. Foi possível observar que o a imagem de fluorescência veio predominantemente do citoplasma fúngico e não parece ter distinção de regiões citoplasmáticas diferentes. Porém, o núcleo não apareceu corado, mostrando que esse fotossensibilizador não ultrapassou a carioteca.

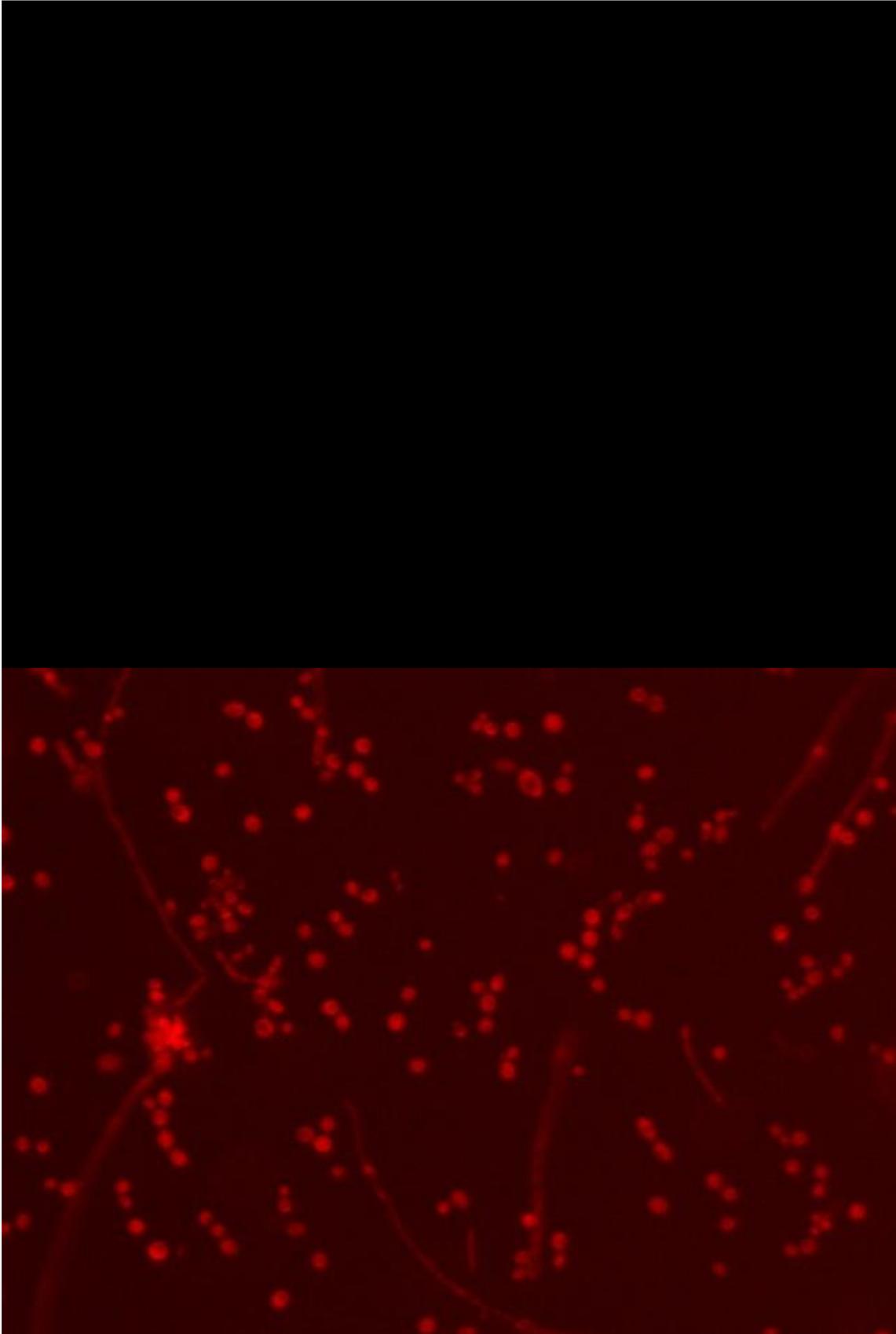


Figura 5- Microscopia de Fluorescência de células de *C. albicans* coradas com 100 μM de eritrosina. 5A- Controle: Células de *C. albicans* não coradas com eritrosina. 5B- células de *C. albicans* coradas com 100 μM de eritrosina

Incorporação de fotossensibilizador

O espectro de absorção da eritrosina foi medido e podemos observar uma absorção que se inicia na faixa de 450 nm e segue até aproximadamente 550 nm.



Figura 6 – Espectro de absorção da eritrosina na concentração de 100 μM em água destilada e deionizada.

Eritrosina foi incorporada ao micro-organismos é podemos notar uma recuperação de sinal de absorção do FS advinda das células coradas e posteriormente digeridas. A coluna da direita na figura 7 mostra que o sinal de absorção foi recuperado das células coradas por 1 min com eritrosina e depois lavadas, centrifugadas e digeridas. Observe que o sinal de absorção das células digeridas encontra-se maior do que o sinal original da concentração de 100 μM , o que indica que as células fúngicas absorveram eritrosina contra o gradiente de concentração.

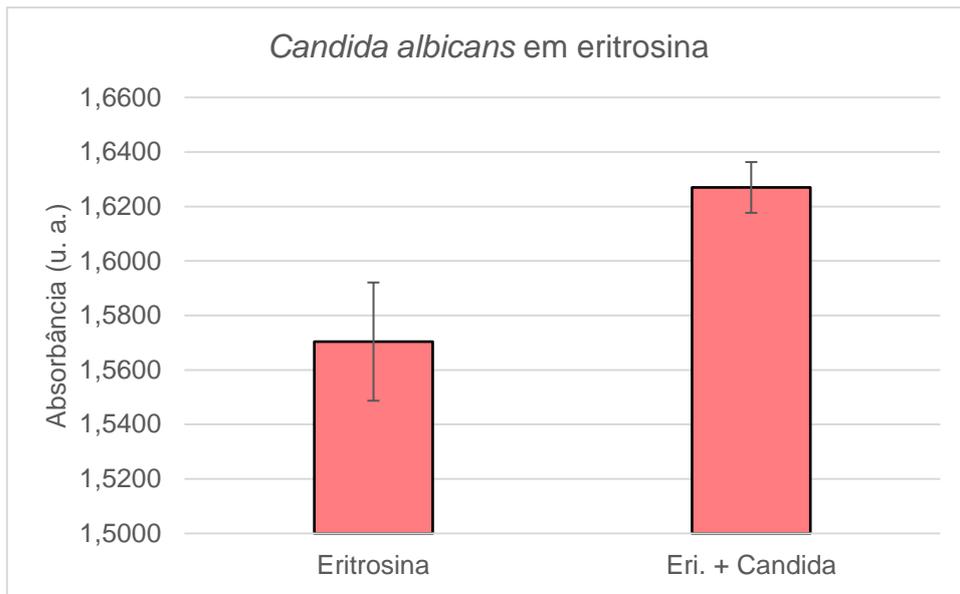


Figura 7 – Leitura de absorbância em 528 nm das amostras de eritrosina a 100 μ M e do sobrenadante da *C. albicans* corada com eritrosina e posteriormente lavada e digerida em NaOH e SDS 1%.

5. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a eficácia do fotossensibilizador Eritrosina na técnica de aPDT em tempos de irradiação variando entre 10 e 720s.

O uso da Eritrosina como fotossensibilizador se mostrou promissora o que foi demonstrado pelo trabalho de Costa et al³¹ (2011).

A utilização de um fotopolimerizador odontológico de luz LED foi proposta visando tornar exequível a técnica de aPDT em consultórios odontológicos sem a necessidade de adquirir equipamentos específicos e de maior custo.

Young-Ho Lee²⁷ demonstraram pela primeira vez o uso de equipamentos convencionais para fotopolimerização de resinas em consultório odontológico. Os autores avaliaram os efeitos da aPDT de uma combinação de eritrosina e uma unidade fotopolimerizadora halogéna padrão, de uso odontológico, na viabilidade de *S. mutans* na fase de biofilme. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa no biofilme in vitro *S. mutans* em resposta a esta simples técnica de aPDT e concluíram que o fotossensibilizador e a fonte de luz usados, eritrosina e uma unidade de fotopolimerização de luz halogéna, comumente usados em clínicas odontológicas, permite obter o efeito aPDT na maioria das clínicas, sem custos adicionais.

Outros diodos emissores de luz (LEDs) de diferentes comprimentos de onda foram testados, especialmente na odontologia^{28,29}.

A associação de LEDs azuis e o corante eritrosina, largamente utilizado em odontologia, torna a terapia mais acessível, pois a maioria dos dentistas já tem essa fonte de luz em seus consultórios³⁰.

Aprovada pela FDA para uso em alimentos/produtos alimentícios a eritrosina é um corante vermelho que foi e já foi aprovado para uso em odontologia e tem sido usado nas últimas décadas como um evidenciador de placa na forma de solução ou comprimidos mastigáveis.

Apesar deste uso seguro, como evidenciador do biofilme dental, ainda são poucos os trabalhos que enfocam seu uso como fotossensibilizador na boca em comparação com outros fotossensibilizadores comumente usados.³³

O uso efetivo deste fotossensibilizador foi demonstrado na morte de células cancerígenas³⁵, bem como para microrganismos como *Streptococcus mutans*²², *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*³⁶.

Em dois destes estudos, os LEDs de uso odontológico foram utilizados como fontes de luz²². O uso deste corante combinado com LEDs também foi testado *in vitro*^{37,38}

A eritrosina se mostra ideal para uso em aPDT em comparação com outros corantes pois tem aprovação para uso na cavidade oral e não apresenta toxicidade direta para o paciente.^{24,34}

Analisados os resultados obtidos no experimento podemos observar que a aplicação de aPDT associado a eritrosina foi efetivo quando o tempo de irradiação foi igual ou superior a 30s. Quando irradiamos as colônias por 10 e 20s nenhuma redução foi observada. Entretanto, quando irradiadas por 30s ocorreu a morte microbiana crescente e proporcional aos tempos de irradiação.

Esta ação se acentuou progressivamente nos tempos de 60 e 90s atingindo 1 log¹⁰ UFCs/ml de redução e no tempo de irradiação de 120s observou-se a ausência de células viáveis, demonstrando que neste tempo a técnica de aPDT associada a eritrosina como fotossensibilizador é efetiva.

Os achados corroboram o trabalho de Gong et al.⁴¹ (2019) que demonstrou que a aPDT mediada por eritrosina mostrou um efeito significativo de morte microbiana em um biofilme cariogênico multiespécies composto por *S. mutans*, *L. casei* e *C. albicans*. No artigo, o autor demonstrou que que o aPDT mediado pela eritrosina mostrou um efeito significativo de morte microbiana de 83,33% e que foi maior que a redução média (38,34%) no biofilme contendo apenas *C. albicans*, relatada anteriormente sob a mesma condição experimental do apor Costa et al³¹(2011). Essa discrepância, segundo o autor, pode estar relacionada aos diferentes tipos de mídia de crescimento em que os biofilmes foram cultivados, aos diferentes componentes do biofilme e às interações entre as espécies.

O estudo com fluorescência mostrou que a eritrosina acumulou no citoplasma das células onde ocorre o seu metabolismo. Isto pode ter levado a

uma inativação mais rápida da célula quando comparado ao azul de metileno que se acumula no citoplasma, núcleo e mitocôndria como demonstrado por Prates et al (2011)²³.

Nossos achados também demonstraram que em um tempo de irradiação inferior aos 180s usado por Costa et al³¹ (2011) ocorre a erradicação microbiana.

Além disto, a concentração do fotossensibilizador, utilizada dentro dos parâmetros de segurança permitem atestar a validade de sua utilização.

Desta forma, os resultados mostraram um grande potencial de ação antimicrobiana da aPDT mediada por eritrosina.

6. CONCLUSÃO

A eficácia da aPDT envolve a otimização de grande número de parâmetros e a seleção de um FS é essencial para o sucesso da técnica. A eritrosina foi efetiva para inativação de *C. albicans* com clara atividade fotodinâmica quando irradiada por luz azul. Os dados encorajam novas investigações para avaliar a efetividade em biofilmes e segurança para o uso em humanos.

REFERÊNCIAS

- 1 – Vioto NML, Yurge LS, Cnerubini K, Cezenove RF. Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida* sp. Rev. Fac. Odonto. 2004; 9(1): 27-33.
- 2 – Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. Med. Mycol. 2018; 56(6):653–667.
- 3 -Ikeh M, Ahmed Y, Quinn J. Phosphate acquisition and virulence in human fungal pathogens. Microorganisms. 2017; 5(3):48.
- 4 – Brown GD, Denning DW, Gow, NA et al. Hidden killers: human fungal infections Sci. Transl. Med. 2012; 4(165):165.
- 5 – Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev. 2007; 20(1):133–163.
- 6 – Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob. Agents Chem. 1995; 39(9):2128–2131.
- 7 – Tulasidas S, Rao P, Bhat S, Manipura R, A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. Infect. Drug Resist. 2018; 11:2443–2448.
- 8 – Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45(9):2475–2479.
- 9 – Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, et al. Antifungal resistance of candida biofilms formed on denture acrylic in vitro. J. Dent. Res. 2001; 80(3):903–908.
- 10 – Grecoa G, Di Piazzaa S, Chanb J, Zottia M, Hannab R, Ghenob et al. Newly formulated 5% 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on *Candida albicans*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020; 29:101575
- 11 –Samaranayake YH, Ye J, Yau JYY, Cheung BPK, Samaranayake LP. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. J Clin Microbiol 2005; 43: 818–25.
- 12 - Williams JL, Stamp J, Devonshire R et al. Methylene blue and the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. J Photochem Photobiol B 1989; 4: 229–32.
- 13 – Carvalho GG, Felipe MP, Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. J. Microbiol. 2009; 47(5):619–623.]
- 14 - F. Pereira Gonzales, T. Maisch Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections, Fungal Biol, 116 (2012), p. 1
- 15 - De Angelis N, Hanna R, Signore A et al. Effectiveness of dual-wavelength (Diodes 980 Nm and 635 Nm) laser approach as a non-surgical modality in the

management of periodontally diseased root surface: a pilot study. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2018; 32(6):1575–1582.

16 – Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW et al. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90(12):889–905.

17 – Prażmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2016; 25(4):799–807.

18 – Pinto AP, Rosseti IB, Carvalho ML, da Silva B, Alberto-Silva C, Costa MS. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue O inhibits the viability of biofilm produced by *Candida albicans* at different stages of development. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2018; 21:182–189.

19 - da Collina GA, Freire F, Santos T et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018; 17(10):1355–1364.

20 – Azizi A, Amirzadeh Z, Rezai M, Lawaf S, Rahimi A. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *J. Photochem. Photobiol. B* 2016; 158:267–273.

21 – Prażmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy As a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2016; 25(4):799–807.

22 – Huang MC, Shen M, Huang YJ, Lin HC, Chen CT. Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm cells of *Candida albicans*. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19:(2).

23 – Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66(7):1525–1532.

24 - Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque related diseases. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 8–13.

25 - Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58: 190–2.

26 - Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2005; 49: 2329–35.

27 - Lee H, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit, *Int J Oral Sci.* 2012; 4(4):196.

28 - Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, Hamblin MR, Rastelli ANS. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review, *Laser Phys.* 2016; 26(12):123.

- 29 - Mylona V, Anagnostaki E, Parker S, Cronshaw M, Lynch E, Grootveld M., Laser Assisted aPDT Protocols in Randomized Controlled Clinical Trials in Dentistry: A Systematic Review, *Dent J (Basel)*. 2020; 8(3):107.
- 30 - M.L.L. Gonçalves, Santos EM, Renno ACM, Horliana ACRT, Cruz MA, Parisi JR, et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2021; 35:102.
- 31 – Costa ACBP, Rasteiro VMC, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2011; 55(1), 56–63.27.
- 32 - Soares BM, Silva DL, Sousa GR et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *Photochem Photobiol B Biol*. 2009; 94:65–70.
- 33 - Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of handheld photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2005; 50:353–9.
- 34 - Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57:680–4.
- 35 - Garg AD, Bose M, Ahmed MI, Bonass WA, Wood SR. In vitro studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells, *PLoS One*. 2012; 7:(4): e34475.
- 36 - Gong J, Park H, Lee J, Seo H, Lee S. Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*, *Photobiomodul Photomed Laser Surg* 37 (5) (2019) 282,
- 37 - Costa AC, Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame Jr M, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy, *Arch Oral Biol*. 2011; 56(11):1299.
- 38 - Costa AC, Campos Rasteiro VM, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*, *Mycoses*. 2012; 55(1):56.
- 39 - Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. 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.
- 40 - da Silva NR, Ribeiro DG, Issa JPM, Bonf´a K, Menezes MS, Oliveira VC, de Souza RF. Preclinical study of a cost-effective photodynamic therapy protocol for treating oral candidoses, *Lasers Med Sci*. 2017; 32(6):1253.
- 41 – Gong J, Park H, Lee J, Seo H, Lee S. (2019). Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2019; 37(5):282-287.

42 – Choi SJ, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. Optimum treatment parameters for photodynamic antimicrobial chemotherapy on streptococcus mutans biofilms. J Korean Acad Pediatr Dent 2015; 42:151–157.