



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

José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves

**Avaliação Dosimétrica da Terapia
Fotodinâmica Antimicrobiana em *Candida albicans*
Com Azul de Metileno veiculado em água e
associado ao Dodecilsulfato de Sódio**

SÃO PAULO, SP
2022

JOSÉ MARCELO LACERDA ALVES GONÇALVES

**Avaliação Dosimétrica da Terapia
Fotodinâmica Antimicrobiana em *Candida albicans*
Com Azul de Metileno veiculado em água e
associado ao Dodecilsulfato de Sódio**

Tese apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título
de Doutor em Biofotônica aplicada às
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pavani

SÃO PAULO, SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Marcelo.

Avaliação dosimétrica da terapia fotodinâmica antimicrobiana em candida albicans com azul de metileno veiculado em água e associado ao dodecilsulfato de sódio. / Marcelo Alves. 2022.

68 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Christiane Pavani.

1. Fotoquimioterapia. 2. Metacromaticidade. 3. Fenotiazínicos.
4. Dosimetria. 5. Dodecilsulfato de sódio.

I. Pavani, Christiane. II. Título.

CDU 615.831

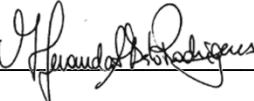
São Paulo, 14 de dezembro de 2022.

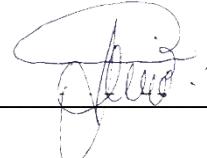
TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves

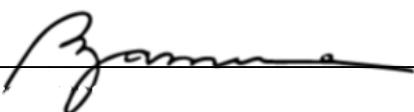
Título da Tese: “Avaliação dosimétrica da terapia fotodinâmica antimicrobiana em cônida albicans com azul de metileno veiculado em água e associado ao dodecilsulfato de sódio”.

Presidente: PROF^a. DR^a. CHRISTIANE PAVANI 

Membro: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES 

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

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES 

Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER 

*Dedico este projeto à minha mãe; **Maria Lucia Lacerda Alves** e ao meu pai
(In Memorian); **José Alves Fernandes**, sem vocês, com certeza absoluta, não
teria êxito.*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, tenho a necessidade de agradecer ao único digno de toda Honra, toda Glória e todo Louvor. O Leão da Tribo de Judá. Obrigado meu Deus, mesmo com todas as minhas falhas e dificuldades, o Senhor me carregou até aqui. Tenho discernimento que sem as suas mãos santas, não realizaria este sonho.

À minha mãe, me ajudando, me fortalecendo, cuidando das minhas filhas, fazendo o meu cuscuz diário, cuidando de mim. Não tenho condições de retribuir tudo que fez por mim mãe, então, obrigado...

À minha irmã, Francisca Suelan, que, até hoje, não encontrei ser humano com melhor capacidade de cuidar e amar o próximo. Sempre disposta a ajudar, estendendo uma mão amiga, um conselho, uma oração. Ah, obrigado pelo “vídeo game” Su!

Ao meu irmão, Marcos Antônio, simplesmente uma criança, num corpo de adulto. Obrigado por simplesmente ser o meu irmão mais velho. Sempre com um sorriso fácil no rosto, obrigado meu velho.

Ao meu irmão, Marcio Lacerda, você é especial...não melhor que os demais, mas especial...és o menino preferido do papai. Acredito que por ser apenas um menino assustado com uma máscara de homem bravo! Obrigado por estar ao meu lado garoto!

Ao meu irmão, Mauricio Lacerda, uma das pessoas mais introspectivas que conheço, contudo, um grande homem, e, que, acompanhou toda a minha batalha, no longo trajeto, te amo meu irmão.

À minha irmã, Gabriela Capucho, delicada como um “elefante em uma

loja de cristais”, obrigado por me fortalecer e estimular à alcançar os meus objetivos.

Obviamente, não há como esquecer de você meu amor; Dinamara Gonçalves, mulher de fibra, garra e determinação. Me “contaminou” com sua força de vontade de vencer. Obrigado por estar ao meu lado todos estes anos, por acreditar em mim, por me fortalecer, mesmo quando nem eu mesmo acreditava! Obrigado meu amor...

À minha filhinha, Julia Gonçalves, obrigado meu amor, por compreender as minhas dificuldades, por não me cobrar pela falta de tempo, por entender que tudo que estou fazendo, é por vocês...te amo!

À Sophia Gonçalves, filhinha, você ainda é muito pequena, e talvez não entenda a importância que tens em minha vida. Obrigado simplesmente por existir! Te amo!!!

À meu Pastor, José Djacy, meu 2º pai. Obrigado por todo carinho e compreensão. Agradeço por estar ao meu lado durante esta longa trajetória, por me adotar, por me chamar de filho no momento em que me senti orfão. Te amo!

À minha mestre/orientadora professora Dra. Christiane Pavani, obrigado por todo conhecimento transmitido durante todos esses anos. Preciso ainda, agradecer por todo carinho e empatia que externou durante a caminhada deste projeto, entendendo as dificuldades que apareceram e absorvendo comigo todas elas, não permitindo que eu passasse por todos estes processos sozinho, obrigado professora!

Estendo os meus agradecimentos aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde; Profa. Dra.

Adriana Lino dos Santos Franco; Prof. Dr. Alessandro Melo Deana; Profa. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira; Profa. Dra. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana; Profa. Dra. Lara Jansiski Motta; Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues; Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari; Prof. Dr. Renato Araujo Prates; Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos; Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori. Todos vocês (sem exceção), de alguma forma, se tornou indispensável nesta trajetória, através de um sorriso durante as dificuldades do dia a dia, ou até mesmo, durante as aulas indispensáveis.

Dentre os professores do Programa, tenho um professor que gostaria de citar de forma especial; Prof. Dr. Paulo De Tarso Camillo De Carvalho (In Memorian). Foi meu professor em uma das disciplinas (Mestrado), porém, disciplina essa, que se tornou indispensável neste projeto. Onde quer que esteja, obrigado por tudo!

Professora Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes, nunca, jamais esquecerei a compreensão que externou por mim e minha família no momento mais difícil de nossas vidas. A palavra que se resume, pode ser descrita como; **empatia!** Obrigado professora!

Aos técnicos do laboratório de pesquisa; André Castilho Verner e Núbia Christine Nóbrega De Queiroz, sem vocês nos auxiliando, com certeza o caminho teria sido praticamente intransitável. Obrigado!

Claro que preciso agradecer ainda, os meus amigos/colegas de jornada; Ellen Perim, Marcia Makabe, Marlon Cruz, Andreia La Selva, Felipe Silva e Thalita Molinos.

Às minhas coordenadoras; Prof^a Neusa Fukuya; Prof^a

Adriana Paula Jordao Isabella; Prof^a Claudia Cristina Soares Muniz; Prof^a Maria Wilsa Cabral Rodrigues Oliboni e Prof^a Fernanda Sebastiana Mendes Pitanga. Jamais esquecerei tudo que fizeram por mim!

Agradeço aos meus professores (da graduação), sim, vocês foram indispensáveis; Zaide Frazão, Miriam Furmankiewicz, Adriana Covino, Joselma Siqueira, Flavia Tamancoldi, Silvia Junior, Deborah Abuhab, Alerrandro Carvalho, Kátia Marcelino, Fernanda Pitanga, Carla Perencin, Priscyla Borges, Wanda Bray, Fernando Franco e João Carlos.

À Universidade Nove de Julho (UNI9), meu agradecimento especial:
A absolutamente tudo que conquistei (profissionalmente), só foi possível porque um dia a UNI9 passou pelo meu caminho; Graduação, Mestrado, Doutorado. A excepcional oportunidade de exercer a docência no Curso Técnico em Enfermagem, na Graduação em Enfermagem e na Medicina. Sem esquecer, é claro, da espetacular experiência como Supervisor de Estágios. Literalmente, devo a esta Universidade, minha eterna gratidão!

Ouve, Senhor, a minha justa queixa; atenta para o meu clamor. Dá ouvidos à minha oração, que não vem de lábios falsos. Venha de ti a sentença em meu favor; vejam os teus olhos onde está a justiça!

Samos 17-1;2.

RESUMO

C. albicans é responsável por quase 78% das infecções fúngicas em hospitais. Os antifúngicos são o tratamento padrão utilizado nestas infecções, porém, é necessário o uso prolongado, que pode, desencadear a seleção de cepas resistentes, além de efeitos colaterais, tais como, a toxicidade hepática. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma opção terapêutica que apresenta a vantagem de não promover resistência, pois, é baseada no uso de um fotossensibilizador como agente microbiano que atua por ativação com luz na presença de oxigênio, agindo por meio da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO). O Azul de Metileno (AM), é amplamente investigado como agente antimicrobiano para TFD, porém, nem sempre efetivo. Em função das condições/protocolos selecionados o AM pode agregar afetando sua ação fotoquímica/fotobiológica, e, inviabilizando o tratamento. Nossa grupo de pesquisa mostrou que o controle da agregação do AM por meio da associação com dodecilsulfato de sódio (SDS) potencializa a ação da TFD. Porém, além disso, a dosimetria também apresenta papel importante nos resultados. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a dosimetria da TFD em *C. albicans* utilizando AM veiculado em SDS. Foram realizados ensaios para quantificar as Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) utilizando o AM em diferentes meios, e parâmetros dosimétricos distintos, são eles: **Controle (água), SDS (0,25%), AM (20 mg/mL) e AM/SDS;** Irradiâncias de 3,7; 11,2; 18,6 e 26,1 mW/cm² variando os tempos de irradiação para atingir as Exposições radiantes de (4,4; 17,8 ; 26,7 e 44 J/cm²). Os resultados obtidos mostraram que o efeito antimicrobiano da TFD do AM associado ao SDS é sempre mais efetivo do que do AM veiculado em água. Além disso, para uma mesma I, somente verifica-se aumento no efeito antimicrobiano em função do aumento da ER na maior I (26,1 mW/cm²). Ao comparar o efeito de diferentes I em um mesmo parâmetro de ER, foi possível observar que apesar de na menor ER não haver correlação entre o efeito antimicrobiano e a I, em todas as demais ER avaliadas essa correlação existiu. Conclui-se que independentemente da dosimetria utilizada, a TFD com AM/SDS tem ação antimicrobiana maior que o AM em água. Segue-se o uso de ER acima de 18J/cm² e I acima de 26Mw/CM², visto que nestes casos, o aumento da dosimetria está correlacionado à maior efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, Metacromaticidade, Fenotiazínicos, Dosimetria, Dodecilsulfato de sódio.

RESUME

C. albicans is responsible for nearly 78% of fungal infections in hospitals. Antifungals are the standard treatment used in these complications, however, prolonged use is necessary, which may lead to the selection of resistant strains, in addition to side effects, such as liver toxicity. Photodynamic Therapy (PDT) is a therapeutic option that has the advantage of not promoting resistance, as it is based on the use of a photosensitizer as a microbial agent that acts by activation with light in the presence of oxygen, acting through the action of reactive species. of oxygen (ROS). Methylene Blue (MA) is widely investigated as an antimicrobial agent for PDT, but not always effective. Depending on the selected conditions/protocols, AM can aggregate, affecting its photochemical/photobiological action, and, making the treatment unfeasible. Our research group showed that the control of AM aggregation through association with sodium dodecyl sulfate (SDS) potentiates the action of PDT. However, in addition, dosimetry also plays an important role in the results. Thus, the objective of this study was to compare PDT dosimetry in *C. albicans* using AM transmitted in SDS. Tests were carried out to quantify the Colony Forming Units (CFU/mL) using MA in different media, and different dosimetric parameters, namely: Control (water), SDS (0.25%), AM (20 mg/mL) and AM/SDS; Irradiances of 3.7; 11.2; 18.6 and 26.1 mW/cm² varying the irradiation times to reach Radiant Exposures of (4.4; 17.8; 26.7 and 44 J/cm²). The results showed that the antimicrobial effect of the PDT of the AM associated with the SDS is always more effective than that of the AM conveyed in water. Furthermore, for the same I, there is only an increase in the antimicrobial effect due to the increase in RE in the highest I (26.1 mW/cm²). When comparing the effect of different I on the same ER parameter, it was possible to observe that, although in the smallest ER, it was not modified between the antimicrobial effect and the I, in all other ER evaluations that existed. It is concluded that regardless of the dosimetry used, PDT with AM/SDS has a greater antimicrobial action than AM in water. The use of RE above 18J/cm² and I above 26Mw/CM² is suggested, since in these cases, the increase in dosimetry is correlated with a greater antimicrobial effect.

Keywords: Photochemotherapy, Metachromacy, Phenothiazinium dyes, Dosimetry, Sodium dodecyl sulfate.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação da Morfologia de <i>C. albicans</i> , Leveduras, Pseudohifas e Hifa verdadeira | 24 |
| Figura 2: Representação do Diagrama de Jablonski | 31 |
| Figura 3: Representação dos Espectros de absorção do monômero (azul) e dímero (vinho) do azul de metileno..... | 33 |
| Figura 3: Representação gráfica dos resultados. Mantendo a irradiância. (10%), alternando a exposição radiante (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm ²). | 42 |
| Figura 5: Representação gráfica. Mantendo a Irradiância (30%), alternando a exposição radiante (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm ²). | 44 |
| Figura 6: Representação gráfica. Mantendo a Irradiância (50%), alternando a exposição radiante. (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm ²). | 45 |
| Figura 7: Representação gráfica. Mantendo a Irradiância (70%), alternando a exposição radiante (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm ²). | 47 |
| Figura 8: Representação gráfica. Mantendo a exposição radiante (4,4J/cm ²) e alternado a irradiância (10%, 30%, 50% e 70%). | 49 |
| Figura 9: Representação gráfica. Mantendo a exposição radiante (17,8J/cm ²) e alternado a irradiância (10%, 30%, 50% e 70%). | 50 |
| Figura 10: Representação gráfica. Mantendo a exposição radiante (26,7J/cm ²) e alternado a irradiância (10%, 30%, 50% e 70%). | 52 |
| Figura 11: Representação gráfica. Mantendo a exposição radiante (44,0J/cm ²) e alternado a irradiância (10%, 30%, 50% e 70%). | 54 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Representação da Revisão da Literatura de TFD antimicrobiana com AM em modelos in vitro com <i>C.albicans</i> | 35 |
| Tabela 2: Representação dos Parâmetros de irradiação..... | 40 |
| Tabela 3: Parâmetros testados no estudo..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Azure A

AB: Azure B

AM: Azul de Metileno

CLH: Células Leveduriformes Hidrofóbicas

CT: Controle

CVV: Candidíase Vulvovaginal

CVVR: Candidíase Vulvovaginal Recorrente

ER: Exposição Radiante

FS: Fotossensibilizador

FSs: Fotossensibilizadores

I: Irradiância

LED: Diodo emissor de luz

PBS: Tampão fosfato salino

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

TFD: Terapia fotodinâmica

UFC: Unidade Formadora De Colônia

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 18 |
| 1. Introdução | 21 |
| 1.1. <i>Candida</i> | 21 |
| 1.2 Tratamento das infecções fúngicas | 30 |
| 1.3 Terapia Fotodinâmica | 32 |
| 2. Objetivos | 40 |
| 2.1 Objetivos Gerais | 40 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 40 |
| 3. Material e Métodos..... | 41 |
| 3.1. Preparo das Soluções..... | 41 |
| 3.2. Fonte de Luz e parâmetros de irradiação | 41 |
| 3.3 Preparo do Inóculo..... | 42 |
| 3.3. Avaliação do efeito da TFD com AM em diferentes Exposições radiantes 43 | |
| 3.4. Avaliação do efeito da TFD com AM em diferentes Irradiâncias . 44 | |
| 3.5. Análise estatística | 44 |
| 4. Resultados | 45 |
| 4.1 Avaliação do efeito da TFD com AM em diferentes Exposições radiantes 45 | |
| 4.1.1 Irradiância 3,7 mW/cm² (10% de potência do equipamento) .. 45 | |
| 4 1.2 Irradiância 11,2 mW/cm² (30% de potência do equipamento) 46 | |
| 4. 1.3 Irradiância 18,6 mW/cm² (50% de potência do equipamento) 47 | |
| 4 1.4 Irradiância 26,1 mW/cm² (70% de potência do equipamento) 48 | |
| 4.2 Ensaios Mantendo a Exposição Radiante | 49 |
| 4.2.1 Exposição Radiante 4,4J/cm² | 49 |
| 4.2.2 Exposição Radiante 17,8J/cm² | 50 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3 Exposição Radiante 26,7J/cm ² | 52 |
| 4.2.4 Exposição Radiante 44,0J/cm ² | 53 |
| 5 Discussão | 55 |
| 6 Conclusão | 58 |
| 7. Referências | 59 |
| 8. Apêndices | 67 |

1. Introdução

1.1. *Candida*

As espécies de *Candida* são organismos que vivem naturalmente em indivíduos saudáveis. São fungos oportunistas, participantes em uma diversidade de doenças superficiais e sistêmicas¹. Atualmente, a literatura apresenta cerca de 200 espécies distintas de *Candida* spp. que podem provocar infecções, porém, grande parte, aproximadamente 95% das candidíases invasivas, são promovidas pelas seguintes espécies de *Candida* spp: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, complexo *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Aproximadamente 50% dos isolados de *Candida* spp. encontrados no sangue, são causadas por *C. albicans*, sendo, *C. glabrata* a segunda em frequência, representa 25% das espécies².

Candida albicans é considerada uma das espécies de fungos mais prevalentes da microbiota humana, possui como uma de suas principais características, a colonização de forma assintomática³. Porém, em condições desfavoráveis, há possibilidade de desenvolvimento de infecções graves e certo risco de vida sempre que as condições do hospedeiro tornam-se vulneráveis, como, por exemplo; alterações significativas no sistema imune, modificações no pH e microbiota residente⁴. *Candida albicans* modifica-se de forma adaptativa no metabolismo e morfogênese, sendo assim, permitindo que este fungo se adeque às variabilidades no hospedeiro⁵.

Vários fatores de riscos estão associados a infecções por *Candida albicans*, dentre eles, estão; uso de antibióticos de amplo espectro, longos períodos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), cirurgias complexas que demandam longos períodos no centro cirúrgico, pancreatite necrosante, hemodiálise e pacientes imunodeprimidos. Outros fatores de risco para desenvolvimento de infecções causadas por *C. albicans*, estão os pacientes que foram submetidos a transplantes de órgãos sólidos, tais como; fígado, rins, pâncreas, coração e pulmões. O transplante de medula óssea, pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes portadores de câncer, indivíduos nascidos em parto prematuro e idosos, podem desenvolver, desde uma simples micose inofensiva, à infecções sistêmicas de grande importância, como a candidíase⁶.

Dentre os tipos mais comuns de candidíase, estão; candidíase oral, vaginal, pele e intestinal. A candidíase oral, pode também, ser denominada de estomatite dentária, ou até mesmo, de candidíase eritematosa, nesse caso, quando promovida em situações de prótese total ou parcial removível⁷.

A estomatite protética é a infecção mais prevalente que atinge a mucosa do palato e o rebordo alveolar, que está interligada diretamente com a base da prótese⁷. A taxa de desenvolvimento possui uma variação média, entre, 25-67%, e a prevalência é proporcional à elevação da idade⁷. Outros fatores que podem favorecer de forma significativa a etiologia da estomatite dentária, estão a oclusão traumática, higiene bucal e de prótese ineficazes, longa permanência da utilização da prótese, processos alérgicos associados aos materiais da prótese, tabagismo, xerostomia, condições sistêmicas, diabetes e imunodeficiência⁷. *C. albicans* é a espécie fúngica mais comum associada em pacientes com estomatite protética, ela é responsável por aproximadamente 70% dos casos de infecção⁸.

A candidíase vulvovaginal, demonstra-se como uma das formas mais tradicionais de infecção genital feminina, atinge 75% das mulheres, pelo menos, uma vez na vida⁹. Geralmente, é mais comum em mulheres na pré-menopausa, entretanto, também afeta mulheres na pós-menopausa, em tratamentos hormonais, principalmente o estrogênio. São considerados fatores de risco para o evento; atividade sexual, antibiótico terapia recente, gestação e a imunossupressão associada ao HIV descompensada, além do diabetes tipo 2⁹. A sua forma recorrente, acomete em média, cerca de 5 a 8% das mulheres e conceitua-se por 4 ou mais episódios em 1 ano⁹. Está diretamente ligada a um desequilíbrio da microflora vaginal, como consequência, alteração quantitativa e/ou qualitativa dos *Lactobacillus* e desenvolvimento de outros comensais da mucosa vaginal, como *Candida albicans*⁹.

A candidíase vulvovaginal é a segunda infecção genital mais incidente nos Estados Unidos e no Brasil,^{10,11} representa 20% a 25% das leucorréias de natureza infecciosa, antecedida unicamente pela vaginose bacteriana. Na Europa, é a primeira causa de vulvovaginite^{9,11} um distúrbio provocado pelo desenvolvimento atípico de fungos do tipo leveduras na mucosa do trato genital feminino. A candidíase vulvovaginal tem como fator etiológico os fungos do tipo leveduriformes; grande parte relacionado ao gênero *Candida*. Cerca de 80% a

90% dos casos são devidos a *C. albicans*; 10% a 20%, à outras espécies chamadas não - *C. albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*), sendo *C. glabrata* a segunda espécie em frequência¹¹.

A candidíase vulvovaginal se caracteriza por uma infecção de vulva e vagina, disseminada por leveduras comensais que residem na mucosa vaginal. Essas leveduras tornam-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro tornam-se vulnerável para o seu desenvolvimento¹⁰. Essa infecção possui como características principais; prurido, ardor, dispareunia (relação sexual dolorosa) e pela excreção de secreção vaginal em grumos. Frequentemente, a vulva e a vagina ficam edemaciadas e hiperemiacadas, em algumas situações, seguido de ardor ao urinar e sensação de queimadura. Estas lesões geralmente estendem-se por períneo, região perianal e inguinal. Esta leucorreia, que normalmente é branco e espesso, é inodoro, e, quando depositado nas vestes a seco, tem aspecto farináceo. Em situações comuns, nas paredes vaginais e no colo uterino, pequenos pontos branco-amarelados são percebidos. Estes sintomas normalmente se agravam no período pré-menstrual, quando o pH vaginal torna-se mais ácido^{10;11;9}.

A candidíase cutânea regularmente ocorre quando há condições favoráveis, tais como; umidade, temperatura e pH propícias, como nas dobras da pele, sob fraldas de recém-nascidos, e em climas tropicais. Diabetes mellitus e o HIV também estão relacionados à candidíase cutânea. Quando aguda, apresenta-se de diversas formas: intertrigo (localizado nas dobras da pele como axilas, virilha, sulco interglúteo, prega submamária, e em pessoas obesas na prega suprapúbica), produzindo intenso eritema, edema, exsudado purulento e pústulas, erosão interdigital, foliculite (determinada pela infecção do folículo piloso principalmente em pacientes com HIV), onicomicose e paroníquia¹².

Na atualidade, a onicomicose envolve mais tipicamente as unhas dos dedos dos pés em comparação com as das mãos, com exceção das infecções por *Candida*^{12;13}. Ela afeta individualmente ou de forma associada às mucosas da pele, unhas, e, em algumas situações, demais órgãos. É de distribuição universal, mais comumente, em recém-nascidos, porém, pode acometer adultos e idosos¹³.

Candida albicans, pode provocar infecções intestinais, uma vez que este fungo é naturalmente um microrganismo encontrado neste local¹⁴. Este fungo é capaz de penetrar a barreira do epitélio intestinal, por meio de células microfoldadas (canais celulares que permitem a abertura e fechamento para regular o fluxo de substâncias e microrganismos no intestino), e na corrente sanguínea¹⁴. O potencial de defesa da barreira intestinal contra este invasor, é totalmente dependente de respostas imunes inatas e adaptativas que permitam ao hospedeiro disseminar fungos patogênicos¹⁴.

Por mais que *C. albicans* seja participante do intestino humano, cavidade oral e microflora vaginal, também é a principal causa de fungemia nosocomial. Em alguns indivíduos vulneráveis, entende-se que as infecções por *C. albicans* se espalhem pelo Trato Gastrointestinal; esta possibilidade é embasada por conhecimentos adquiridos de estudos em pacientes e modelos animais¹⁴. *C. albicans* pode ser precursora de doenças com risco de vida com taxas elevadas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos, bem como, em pacientes realizando terapia imunossupressora. *C. albicans* é o patógeno fúngico mais comum visto em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) e promove infecções que podem promover sepse grave e choque séptico, ambos relacionados a elevadas taxas de morbidade e mortalidade¹⁴.

As infecções causadas por fungos, têm elevado significativamente nos últimos anos e são fontes de uma importante causa de mortalidade e morbidade em pacientes internados em unidades hospitalares¹⁵. As espécies de *Candida* são responsáveis por até 78% das infecções por fungos hospitalares¹⁵. Ainda é possível afirmar que a taxa de colonização em indivíduos internados é considerada superior à da comunidade de uma forma geral¹⁵. Procedimentos clínicos, doença subjacente e maior permanência em internações, podem contribuir para a ligeira disseminação de agentes colonizadores que podem causar infecções¹⁵.

Ultimamente, o número de candidíases com etiologia provocada por espécies de *Candida não-albicans* vem se intensificando. Na década de sessenta, apenas cinco espécies de *Candida* eram conhecidas na literatura como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* e *C. guilliermondii*. Em 2003, era sabido até aquele momento, dentro de um gênero de quase 200 espécies descritas,

apenas 17 eram as que promoviam micoses superficiais ou invasivas. As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Todavia, tem sido progressivo o relato de casos de candidíases superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida*, envolvendo isolamentos de *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. haemulonii*, dentre outras¹².

Durante muitos anos, imaginava-se que as leveduras atuavam de forma secundária no processo da patogênese, ou seja, não era necessariamente ativa na efetividade da infecção fúngica. Desta forma, a debilidade orgânica ou imune do hospedeiro era entendida como único mecanismo precursor para o desdobramento da infecção oportunista¹⁶. Nos últimos anos esse conceito tem sido alterado. É unânime que esses microrganismos participam de forma ativa do processo fisiopatogênico da doença, atribuindo os mecanismos de agressão conhecidos como fatores de virulência¹⁶. Os fatores de virulência de maior importância das leveduras são: capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, que degeneram os tecidos do hospedeiro; produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; capacidade de adesão a células e tecidos; formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas; produção de tubo germinativo por algumas espécies de *Candida* spp.; produção de hemolisinas; hidrofobicidade da superfície celular e resistência ao peróxido de hidrogênio. Todavia, sabe-se que há uma ação sinérgica entre vários mecanismos de agressão, nas quais, quando associados ao declínio na resposta imunológica do hospedeiro, é possível o aparecimento da candidíase¹⁶.

C. albicans pode se desenvolver em uma diversidade de formatos morfológicos, diversificando de levedura em brotação à pseudo-hifas e hifas (**Figura 4**)¹⁷. *C. albicans* é um fungo que se apresenta comumente sob formas leveduriformes, isto é, de morfologia arredondada, formada por microrganismos unicelulares. Apresenta-se no estado saprofítico (fungos que se alimentam absorvendo matéria orgânica em decomposição), nesta, quando associado à colonização assintomática¹⁰. Podem apresentar-se em formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), sendo que essas morfologias são identificadas em processos patológicos¹⁰. Quando este fungo está situado em

condições de crescimento favorável, pode promover a criação de clámidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Assim, esse fungo provavelmente se adaptará a distintos abrigos biológicos. Desta forma, *C. albicans* é considerado um organismo pleomórfico, isto é, possui capacidade de variar sua forma de acordo com o período do ciclo de vida/reprodutivo ou das condições ambientais¹⁰.

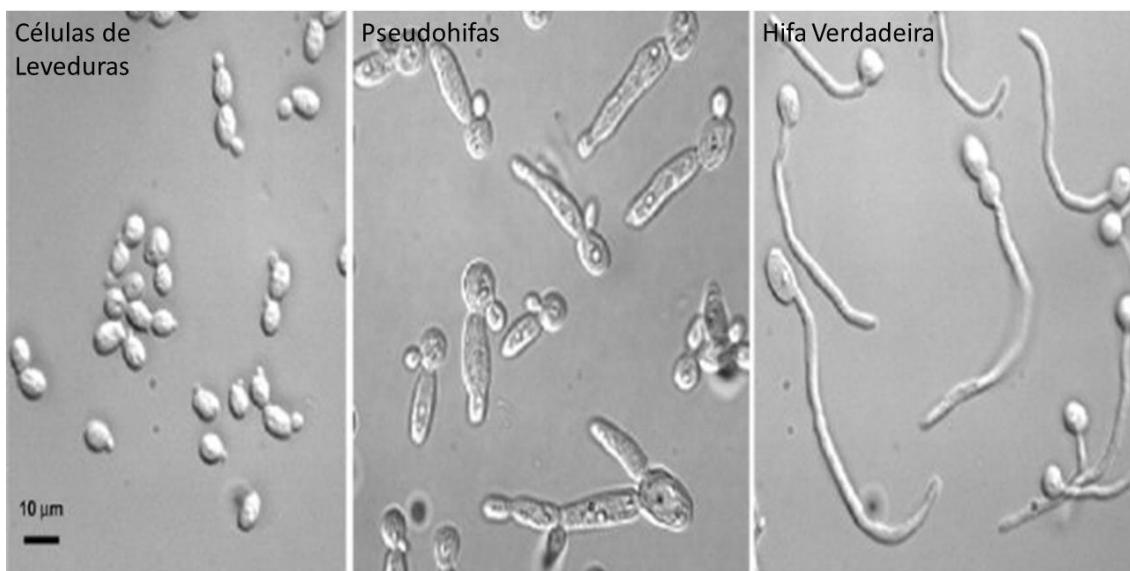


Figura 4. Morfologia de *C. albicans*. Leveduras, Pseudohifas e Hifa verdadeira¹⁸.

Na morfologia apresentada por hifas, se intensifica pela forma mais patogênica¹⁷. Obviamente as condições do hospedeiro são de extrema importância para que este fungo possa desencadear importantes infecções¹⁰. Contudo, as diferenças na capacidade que este fungo possui em causar doenças com suas manifestações clínicas entre hospedeiros suscetíveis são relevantes¹⁰. O fungo não é considerado apenas um coadjuvante no processo infeccioso, podemos observar diversos fatores de virulência¹⁰.

A virulência de um microrganismo é conceituada como sua capacidade de disseminar doença mediada por vários fatores¹⁰. Todavia, apesar de alguns aspectos da virulência serem definidos geneticamente, eles são viabilizados pelos microrganismos somente quando o seu hospedeiro se posiciona em uma condição imunológica desfavorável, ou dentre algumas outras condições, tais como; teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura¹⁰. Entretanto, essas situações são específicas para cada microrganismo, devendo promover variação

de hospedeiro para hospedeiro¹⁰. Dentre os fatores de virulência de *C. albicans* que são protagonistas e possuem grande relevância no processo infeccioso, estão; adesão a substratos inertes e biológicos, formação de tubo germinativo com consequente desenvolvimento da forma filamentosa, variabilidade fenotípica, variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e hidrofobicidade de superfície celular¹⁰.

Poucos microrganismos não-invasivos encontram-se aderidos à superfície hospedeira, outros, usam essa adesão como a etapa inicial para a ocupação tecidual¹⁰. O acontecimento inaugural na patogênese de doenças infecciosas é a aderência microbiana aos tecidos hospedeiros. É requisito considerado básico para que uma infecção seja estabelecida que o patógeno entre em contato com a camada de cobertura da superfície epitelial da mucosa do hospedeiro. A aderência duradoura entre o fungo e o tecido do hospedeiro suplica o estabelecimento de ligações características entre estruturas complementares presentes no exterior do patógeno e da célula epitelial¹⁰. A adesão de patógenos à superfície de células eucarióticas é conciliada por macromoléculas intituladas de adesinas (estruturas da superfície do microrganismo que interatuam com receptores característicos nas células eucarióticas)¹⁰.

Um fungo pode manifestar uma ou mais adesinas, e essa expressão é organizada por fatores ecossistêmicos ou do próprio hospedeiro¹⁰. Há indícios que *C. albicans* pode gerar mais de uma estrutura adesiva, sendo que, a uma manoproteína está primordialmente proposta a incumbência adesiva nas maneiras de adesão¹⁰. A adesão de *C. albicans* a superfícies mucosas tem sido representada como um significativo passo no processo infeccioso, especialmente na cavidade oral e na mucosa vaginal¹⁰.

Hidrofobicidade de superfície celular: Representa virulência exacerbada, certamente por incentivar fenômenos de aderência, vigor à fagocitose e germinação. Mesmo sabendo que o mais potente mecanismo abrangendo a aderência esteja naturalmente relacionado com uma adesina manoproteína de *C. albicans*, HSC tem sido retratada por diversos pesquisadores como ligada na aderência¹⁰.

Produção de tubos germinativos: A competência de mudança morfológica de *C. albicans* tem sido colocada como significante fator de virulência¹⁰. As hifas possuem elevada habilidade de aderir e adentrar nas células epiteliais humanas quando comparadas aos blastoconídios¹⁰. Microrganismos incapazes de gerar hifas perdem a virulência de seus parentais¹⁰. Essas transições simbolizam uma resposta do fungo a modificações nas circunstâncias ecossistêmicas e permitem a sua adequação a desiguais nichos biológicos, e a decorrente disseminação fúngica nas células humanas¹⁰. Esses indícios fortalecem o conceito de que a perícia de formar hifas simboliza significativa incumbência na patogênese de *C. albicans*. Estudos já mostraram a fusão entre sinais clínicos de CVV e a criação de tubos germinativos pela levedura¹⁰.

Variabilidade fenotípica: Pode ser definido como modificação fenotípica na morfologia das colônias de *C. albicans*. Geralmente são existentes diversas distinções entre as colônias que apresentam variabilidade e as demais, abrangendo alterações no formato, estruturas de superfície celular e germinação a 37°C, que apresentam ser mais virulentas¹⁰.

Variabilidade genotípica: Dentre os sistemas de tipagem molecular usados para diferenciar isolados de *C. albicans*, pode-se realçar o polimorfismo de fragmentos de DNA conseguidos com enzimas de restrição. Diversos estudos genéticos têm definido que, na maior parte dos casos de Candidíase Vulvovaginal recorrente (CVVR), um único isolado tem sido incumbido pelos acontecimentos sintomáticos contínuos. Contudo, a levedura causadora pode ser substituída em algumas circunstâncias¹⁰.

Produção de exoenzimas: Diversas estruturas desenvolvidas por *C. albicans* têm sido relacionadas à infecção, ou seja, determinadas como fatores de virulência. As infecções por esse microrganismo estão diretamente associadas com a disseminação de exoenzimas. Recentemente, elas têm sido conhecidas como um dos mais relevantes fatores de virulência de *C. albicans*¹⁰. Espécies alteráveis de *C. albicans*, com habilidade de secreção de proteinases deficiente ou diminuída, são minimamente virulentas quando comparado com as que possuem essa especificidade. As enzimas do tipo fosfolipase, da mesma forma, estão relacionadas à virulência de *C. albicans*¹⁰.

Tigmotropismo e internalização: A etapa primária da infecção à superfícies mucosas pelas matrizes filamentosas de *C. albicans* é habitual como

tigmotropismo, que consiste em um contato dirigido, em adição à liberação de diversas enzimas hidrolíticas, sendo a mais relevante, nesse caso, a fosfolipase¹⁰. Apesar de não fagocíticas, culturas de células epiteliais vaginais e bucais, mostram um fenômeno denominado "internalização celular" de organismos e ostentam uma fagocitose diferente. Porém, tem sido referido que blastósporos de *C. albicans*, independente de sua viabilidade, são capazes de provocar fagocitose em cultura de células endoteliais¹⁰. Exclusivamente as pontas das hifas em desenvolvimento e não os blastósporos aparentam invadir exatamente na superfície das células epiteliais (internalização) e em suas junções (tigmotropismo), sugerindo que um mecanismo não prevalece sobre o outro para penetração nos tecidos pelas leveduras¹⁰.

A aderência de um microrganismo cogitando na sua competência de formar biofilmes (diferente tipo de aderência, na qual, os microrganismos constituem agregados unicelulares, produzindo estruturas multicelulares que aderem a superfícies). Sua criação acontece em retorno a uma diversidade de condições, incluindo elevada densidade celular, abstinência de nutrientes e estresse físico ecossistêmico¹⁰. Na Candidíase Vulvovaginal, a consideração da competência da criação de biofilme é de grande relevância, devido à probabilidade de episódio em dispositivos intra-uterinos (DIU). Todavia, apresenta-se significância nas infecções não associadas ao DIU, pois, algumas células fúngicas na mucosa vaginal podem estar com uma combinação de espécies disseminando biofilmes, além disso, com bactérias residentes. Essas leveduras possuem elevada resistência à terapia antifúngica tradicional e isso pode ser encarregado pela não-erradicação da *C. albicans* do lúmen vaginal¹⁰.

É importante entender que, como em diversos outros patógenos, se estabelece certa potencialidade em causar infecções, quando ocorre a capacidade de formar biofilmes¹⁹. Quando formados, os biofilmes de *C. albicans* são resistentes à agentes antifúngicos e à resposta imunológica do hospedeiro, e podem atuar como reservatórios para manter infecções persistentes, bem como, para semear novas infecções em um hospedeiro¹⁹.

As proteinases secretórias, como fatores de virulência da *Candida*, costumam efetivar a potencialidade dos organismos fúngicos em ocupar e penetrar no tecido do hospedeiro e promover alterações significativas no sistema imune¹. O desenvolvimento de fosfolipase é outro fator de grande importância

de virulência de *C. albicans*, que promove a ligação do fungo ao tecido alvo e desencadeia uma via de entrada no tecido após a hidrólise de fosfolipídios e a degradação das membranas celulares¹. Além de que, a hemolisina, descreve-se como outra enzima extracelular, que colabora para a ocupação de leveduras pela absorção de ferro¹. A criação do biofilme, outra causa de virulência de *C. albicans*, exerce um papel centralizado na patogênese dos fungos, por meio da produção em massa de pseudo-hifas¹. O biofilme abrange células de levedura densas e hifas, que devem promover à resistência antifúngica, como também, o ressurgimento constante de infecções por *Candida*¹.

1.2 Tratamento das infecções fúngicas

As doenças bacterianas e fúngicas atacam centenas de milhares de pessoas ao redor do planeta diariamente. Milhares de doses de antibióticos são receitados todos os anos para tratar essas infecções, desta forma, intensificando a problemática vivenciada da elevação da resistência bacteriana/fúngicas a estes antibióticos. A contrapartida que a sociedade precisa arcar em relação a esta desordenada utilização farmacológica, é, além do custo monetário anualmente muito elevado para tratar estas infecções resistentes, diversas vidas são ceifadas decorrentes de terapias ineficientes²⁰. O tratamento das infecções fúngicas são comumente realizados por meio do uso dos antifúngicos azóis²¹.

Dentre os antifúngicos utilizados no tratamento de candidíases invasivas, podemos destacar os triazólicos, como; fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e, do grupo das equinocandinas, a caspofungina²².

O fluconazol é abrangemente usado, pois, é apontado como primeiro antifúngico sistêmico com toxicidade minimizada e excepcional representação farmacocinética, além de apresentar formulações orais e/ou intravenosas²³. Porém, seu uso durante grandes períodos e de forma indiscriminada, é responsável por desencadear nas últimas décadas, modelos de cepas resistentes³.

No Brasil, infecções por *Candida* spp tem se apresentado de 2 a 15 vezes mais incidente que em países do Hemisfério Norte, tendo sido o quarto principal fungo isolado em hemoculturas. A resistência fúngica desta, tem ocorrido fortemente aos azólicos²⁴.

Vários são os fatores que viabilizam a resistência fúngica aos antifúngicos, dentre alguns, são eles:

Resistência clínica: É promovido quando o fungo é aparentemente vulnerável ao antifúngico in vitro, porém, não in vivo, devido à impossibilidade do antifúngico agir no seu alvo. Geralmente ocorre pacientes imunodeprimidos, neutropênicos, infecção em tecidos com pouca vascularização ou abcessos fechados, descomprometimento do tratamento por parte do paciente, formação de biofilmes em próteses e cateteres²².

Produção de Biofilme: Algumas espécies de leveduras do gênero *Candida* possui habilidade de formar biofilme, *C. albicans* é uma delas²².

Resistência microbiológica: Envolve mecanismos moleculares e pode se apresentar de forma intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microrganismo e confere a ele a resistência inata antes da exposição ao antifúngico. Geralmente acontece, por exemplo, com a espécie de *C. krusei*, que possui resistência intrínseca ao fluconazol²². A resistência adquirida ocorre em microrganismos que tiveram a capacidade de promover mutações após serem expostas ao antifúngico e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes²².

Em estudos realizados na Colômbia entre 2003 e 2015, foi listado que a regularidade de resistência de *C. albicans* ao fluconazol altera entre 1,1 e 8,6%. Dentre os mecanismos associados à resistência antifúngica, o que podemos indicar inicialmente à redução da sensibilidade de *Candida* aos azóis, é a indução de bombas de expulsão que reduzem a concentração do fármaco na célula fúngica²³.

O grupo inicial dessas proteínas de membrana corresponde às CDRs, grupo de transportadores do tipo ABC (*cassete de ligação ATP*), que expulsam diversos compostos através de um mecanismo ativo submisso de ATP. Em *C. albicans* que tenham descritos, dois desses genes, a *CDR1* e *CDR2*, são sobre-expressas em mais de 50% das estirpes resistentes antifúngicas²³. O gene *MDR1* codifica a proteína de 564 aminoácidos, conhecida como Mdr1, que é um condutor tipo I de distintas moléculas, englobando drogas. Esta proteína

pertence à *superfamília da Grande Facilitadora (SGF)*. Foi exposto que sua super-expressão contribui para o curso externo de azóis, geralmente utilizado no tratamento da infecção por *C. albicans*²³.

Outro mecanismo habitual de resistência em espécies de *Candida* é a super-expressão do gene que codifica a enzima alvo (*ERG11*), que eleva os níveis da enzima 14a lanosterol desmetilase na membrana do fungo e pode guiar os azóis a não terem compatibilidade com a enzima²³.

Além disso, em relação ao fluconazol e a caspofungina, ambos apresentam efeitos adversos farmacológicos, e ainda, toxicidade²⁵. Como esses fármacos possuem a metabolização por via hepática, os principais efeitos adversos apresentados, são náuseas e vômitos, quando administrados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico²⁶. Mediante as desvantagens apresentadas pelos tratamentos convencionais, nota-se a importância do desenvolvimento de outros métodos terapêuticos, a fim de que seja possível melhorar a eficácia do tratamento, além de minimizar ou erradicar os efeitos colaterais. Neste sentido, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se demonstrado uma excelente opção terapêutica, como uma forma de tratamento promissora²⁷.

1.3 Terapia Fotodinâmica

A TFD é utilizada para destruição seletiva de um tecido e requer um agente fotossensibilizador (FS), no tecido-alvo, uma fonte de luz e oxigênio^{28;29;30;31}. O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica é exemplificado pelo Diagrama de Jablonski, conforme apresentado na *Figura 5*.

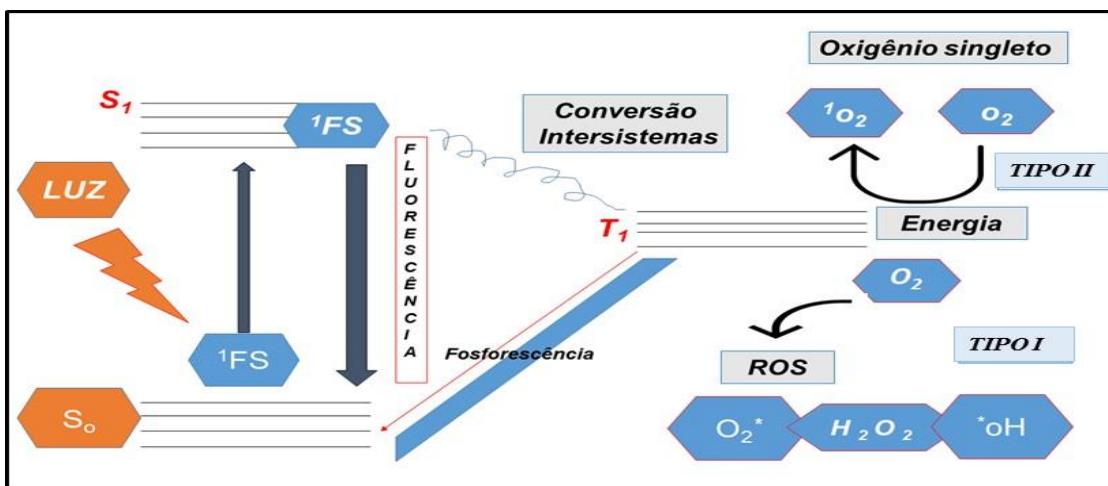


Figura 5. Diagrama de Jablonski (adaptado de Biofotônica, conceitos e aplicações, 2017)

Quando um fóton de luz é absorvido pelo fotossensibilizador, ocorre a excitação do mesmo, saindo de seu estado fundamental, e atingindo o estado excitado singlete. Assim, o FS poderá regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência, por processos não radiativos ou passar ao estado excitado tripleto. No estado tripleto o FS poderá reagir com o oxigênio molecular de duas formas diferentes; formar espécies reativas de oxigénio (reação do tipo I) ou formar o oxigênio singlete (reação do tipo II)³².

O azul de metileno (AM) é o corante mais conhecido quando se trata da TFD antimicrobiana, sendo conhecido por sua elevada absorção da luz na região vermelha do espectro eletromagnético^{30,33–37}. Entretanto, não há um consenso nos parâmetros dessa terapia, tais como, concentração do AM, meios de veiculação, tempo de incubação no escuro (ou também chamado de tempo de pré-irradiação), irradiação (I), exposição radiante (ER), tempo de irradiação, entre outros fatores, como demonstrado na revisão bibliográfica realizada pelo presente estudo (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros associados ao fotossensibilizador, a concentração e o meio de veiculação são parâmetros que devem ser padronizados. Em termos da concentração do AM, a variedade de grandezas utilizadas pode dificultar leitores das diferentes áreas que utilizam TFD. Convertendo todas as concentrações utilizadas nos artigos para uma mesma unidade, nota-se variação entre 5 e 626 µmol/L (Tabela 1).

Em termos do meio de veiculação do AM, a maioria dos artigos refere água, solução fisiológica, PBS ou meio de cultivo. Recentemente foi relatado que

o meio de diluição do FS é extremamente relevante para a eficiência da TFD³³, sendo que o uso do AM em uma mesma concentração em água, PBS ou soro fisiológico não leva à redução na quantidade de unidades formadoras de colônias enquanto que a associação com SDS 0,25% leva à inativação microbiana. Uma das justificativas desta diferença é a metacromaticidade (ou agregação) do AM, isto é, dependendo do microambiente no qual é inserido, AM está presente na forma de dímeros ou monômeros^{38,39}. O grau de agregação dos AM pode ser analisado por espectro de absorção, enquanto os monômeros exibem absorção máxima a 664nm, os dímeros têm esse máximo deslocado a 590nm^{33,38,39}. Para cada estado de agregação, há uma resposta fotoquímica diferente, o que afeta a efetividade da terapia. A excitação de dímeros e monômeros desencadeia diferentes mecanismos fotoquímicos: enquanto a excitação de monômeros resulta em produção de oxigênio singlete (tipo II), a excitação dos dímeros gera radicais, tais como, ânions radical superóxido (tipo I reações)³⁹. A associação do AM com SDS controla a agregação, de forma que existem mais monômeros em solução e o mecanismo tipo II é predominante^{33,34}.

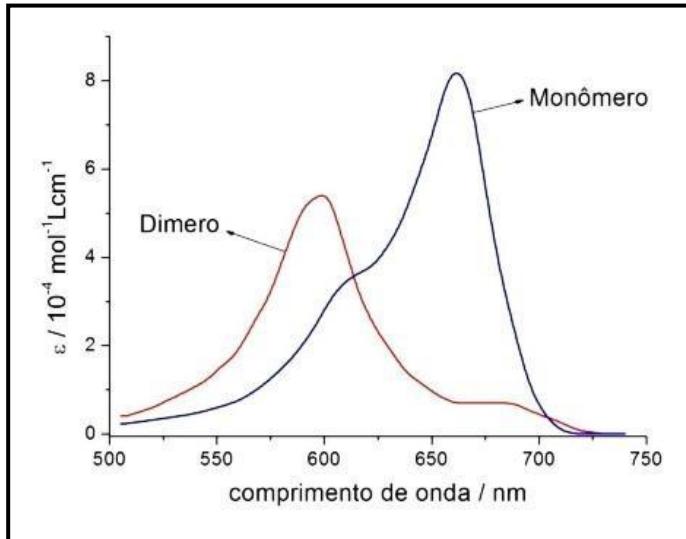


Figura 6. Espectros de absorção do monômero (azul) e dímero (vermelho) do azul de metileno^{38,40}.

Em termos do tempo de pré-irradiação, alguns trabalhos usam tempos menores (2 minutos) ou maiores (30 e 60), apesar de um número elevado de trabalhos apresentarem consenso no uso de 5 minutos (Tabela 1).

Uma vez que temos fortes indícios que o meio de solubilização é fundamental para a eficiência da TFD antimicrobiana^{33,34}, outro ponto, que está inserido como

foco principal deste estudo, é o papel da dosimetria empregada na terapia. Pensando incialmente nos períodos de incubação, o grupo, em estudos anteriores, realizou testes entre 1 e 20 minutos, sendo; 1, 5, 10, 15 e 20^{33;41}. Foi identificado que não há notoriedade significativa em manter diferentes tempos de incubação, e que, a alternância nestes períodos, não proporcionaram um aumento na efetividade da TFD antimicrobiana³³. Os períodos de incubação, são necessários para que o FS possa integrar com o microrganismo, se inserindo ou promovendo uma ligação no plasma da membrana, desta forma, quando o FS for fotoativado, possa efetivamente causar algum prejuízo ou danificar integralmente a membrana microbiana³³. A parede celular de *C. albicans* possui uma formação bastante diversa, possuindo cinco camadas: Membrana plasmática, uma manoproteína camada, uma camada de β-glucano / quitina, uma camada de β-glicano, outra camada de manoproteína e uma camada fibrilar (mais externa). Ou seja, é fundamental certificar-se que o FS possa integrar-se à parede celular, pois, o FS só terá o seu efeito biológico (fotoativação) promovido, se esta interação ocorrer³⁴. Andrade *et al*, avaliou alguns períodos de incubação, e identificou que os melhores períodos foram relacionados entre 4 a 8 minutos para distintas espécies de *C. albicans*⁴². Entendendo que não há relevância estatística para alterarmos o período de incubação, para este projeto, foi mantido o período de 5 minutos

Tabela 1: Revisão da Literatura de TFD antimicrobiana com AM em modelos in vitro com C.albicans.

| Artigo | Concentração ($\mu\text{mol/L}$) | TPI ^a (min) | Meio Diluição | Fonte de luz | λ (nm) | Tempo (min) | Potência (mW) | Irradiância (mW/cm ²) | Exp. Radiante (J/cm ²) | Resultados |
|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|--|--------------|----------------|--------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------------|--|
| COLLINA, 2018. ³³ | 31-313 | 5 | água, salina, PBS, SDS, ureia | LED | 640 \pm 12 | 30 | | 2,6 | 4,7 | reduziu 3 log ₁₀ UFC/mL a 61 $\mu\text{mol/L}$ somente quando veiculado em SDS, nos demais meios não houve redução |
| DAI, 2011. ⁴³ | 20 | 30 | PBS | Não coerente | 660 \pm 15 | 0-5 | | 32,5 | 0; 1,95; 3,90; 5,85; 7,80 e 9,75 | A TFD com MB não causou redução nas UFC quando comparado ao CT |
| DALIRI, 2019. ⁴⁴ | 313 e 626 | - | salina | Laser | 660 | 1,6 e 10 | 10 e 100 | - | - | Não houve redução nas UFC na TFD com AM (nas 2 concentrações utilizadas) em relação ao grupo Laser; Houve aproximadamente 0,5 log de redução quando AM foi usado no escuro, nas concentrações citadas. |
| LYON, 2012. ⁴⁵ | 25, 50 e 100 | 60 | PBS | LED | - | 15 | - | 200 | 180 | Houve redução de 320 para 240 UFC somente na maior concentração |
| OLIVEIRA, 2014. ³⁰ | 5,0 | 2 | salina | Laser | 660 | 3 | 100 | - | - | Redução de 0,5 log em relação ao grupo CT. MB no escuro 0,19log de redução em relação ao grupo CT. |
| PUPO, 2011. ⁴⁶ | 313 | 5 | salina | | 660 \pm 30 | 5 | 40 | 105 (0.38 cm ²) | 53 | Redução de 0,43 log em relação ao grupo CT. MB no escuro 0,07log de redução em relação ao grupo CT. |
| SABINO, 2019. ⁴⁷ | 100 | 10 | PBS | LED | 660 \pm 10 | - | - | 100 | 25 | Redução de 3,0 log em relação ao grupo CT. |
| SILVA, 2016. ⁴⁸ | 313 | 5 | Água Destilada | Laser | 660nm | 1,5 ; 3; 4,7 | 100 | 3.571 | 321; 637 999 | Redução máxima de 0,5 log em relação ao grupo CT no maior tempo de irradiação. |
| SOUSA, 2015. ⁴⁹ | 469 | 5 | Agar Sabouraud Dextrose / salina (1:1) | Laser | 660 | 2,1 | 100 | 3333 | 426 | Redução de 3,41 log em relação ao grupo CT. MB no escuro não causou redução em relação ao grupo CT. |

Podemos afirmar que a luz pode impossibilitar células e/ou microrganismos por meio de reações fotoquímicas (TFD), desta forma, a análise ideal dos parâmetros dosimétricos são essenciais, a fim de se estabelecer uma terapêutica efetiva na aplicação⁵⁰. Em termos da dosimetria, os conceitos e parâmetros que devem ser considerados para o protocolo da TFD, são:

POTÊNCIA: A potência regula quantos fótons são emitidos pelo equipamento, e, sendo assim, não pode haver engano quanto ao seu valor. Quando o modo de operação do equipamento é pulsado, ou seja, fótons expostos ao alvo biológico de maneira pulsada, a potência pode apresentar uma variação com valor máximo (potência pico) e zero, de forma que é a potência média dos fótons que é expressivo para o cálculo dosimétrico. Quando o modo de operação do equipamento é contínuo, a potência dos fótons persiste inalterável por todo período de tempo e é idêntico a potência média. A potência é fornecida pelo fabricante do equipamento, porém, recomenda-se a aferição por meio de um aferidor de potência. É uma grandeza que descreve o fluxo da energia em função do tempo, sendo descrita em unidade de medida do sistema internacional - Watts (W), que equivale à um Joule por segundo (J/s)⁵⁰.

IRRADIÂNCIA: Pode ser descrita como a potência média incidente na superfície do alvo biológico. Ou seja, representa a densidade de potência, porém, densidade de potência é uma expressão apropriada quando mencionamos a potência média por unidade de área que sai do equipamento. Ao nos referirmos à potência média que incide numa determinada área do alvo biológico, a nomenclatura correta seria I, apesar de a unidade de medida ser a mesma em ambas as situações. A I é a grandeza que indica a probabilidade de dano térmico, ou seja, quanto maior seu valor, maior a probabilidade de dano térmico ao alvo biológico. Pode ainda ser definida como o fluxo radiante por unidade de área recebida por uma superfície (isso inclui as superfícies de objetos físicos, como amostras de tecidos ou culturas de células, e o espaço ocupado entre eles, como o ar ou a espessura do tecido). Irradiância, geralmente é medida em watts por centímetro quadrado (W/cm²).

Exposição Radiante: É a energia incidente na superfície do alvo biológico. Conceitua-se pela densidade de energia, porém, a densidade de energia é um termo adequado quando nos referimos à energia por unidade de área que sai do equipamento. Quando nos dirigimos à energia que incide numa determinada área do alvo biológico, a terminologia correta seria Exposição Radiante (ER), embora a unidade de medida seja a mesma em ambas as situações⁵⁰. Caracteriza-se por energia entregue por unidade de área na superfície do tecido, expressa em Joules por centímetro quadrado (J/cm^2)⁵⁰.

Outro aspecto observado entre os trabalhos selecionados, é a inconsistência da dosimetria da irradiação, onde podemos citar uma ampla faixa de Irradiância (I) utilizada nos trabalhos (de 2,6 a 3571 mW/cm²), bem como, da ER (de 1,95 a 999 J/cm²)⁵¹.

Em termos dos resultados obtidos, vários estudos mostram ausência de efeito da TFD antimicrobiana, ou redução mínima (0,5Log) nas Unidades Formadoras de Colônias (UFC)⁵¹.

As inconsistências nos resultados obtidos nestes estudos, podem ser atribuídas à concentração de corante ou aos parâmetros utilizados para irradiação⁵¹.

Na tabela 1, foi apresentada uma inativação do microrganismo (isto é, redução mínima de 3 Log), em dois protocolos bem distintos: Souza e colaboradores⁴⁹ utilizaram 469 µmol/L, em uma mistura 1:1 de solução salina com meio de cultivo, 3333 mW/cm² e 426 J/cm², por outro lado, Collina e colaboradores³³ atingiram o mesmo resultado com parâmetros bem menores (61 µmol/L, 2,6 mW/cm² e 4,7 J/cm²) por associar AM com SDS 0,25%. Nesse âmbito, há imensa necessidade de estudos que possam padronizar a aplicação da TFD na atividade antimicrobiana para *C. albicans*, uma vez que, dependendo do estado de agregação, os parâmetros de exposição à luz (necessários) também podem variar³³. Em estudo anterior do grupo, foi apresentada a relação entre a agregação dos FS fenotiazínicos e a morte celular fotoinduzida, sendo que, quanto menor a agregação, maior a extensão de morte celular⁵².

Sabe-se que a agregação reduz a produção de oxigênio singlete, o mecanismo tipo II, porém, a presença de agregados já foi relacionada à produção de outras espécies reativas de oxigênio, do mecanismo tipo I³⁹. Sendo assim, é possível indicar que a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

é inversamente proporcional à agregação, isto é, a produção destas espécies é maior, quanto menor a agregação do FS³².

Uma vez que, a concreta determinação dos parâmetros utilizados na TFD antimicrobiana são essenciais para a efetiva resposta terapêutica⁵¹.

Podemos perceber na literatura que não há um consenso no que diz respeito à dosimetria da TFD Antimicrobiana. Alguns estudos descrevem análises de ER e I de formas distintas e divergentes^{19,53,54}.

Outro fator preponderante para a resposta terapêutica da TFD antimicrobiana, está relacionada à efetividade do fotossensibilizador. Estudos anteriores do grupo, demonstraram que a efetividade da fenotiazina está diretamente associada com a agregação do FSs^{33,39}. Em relação ao azul de metileno, a elevação na concentração e a depender do meio utilizado, é possível uma maior interação hidrofóbica entre suas moléculas, potencializando a agregação³³. Neste contexto, alguns estudos demonstraram eficácia terapêutica do AM, na terapêutica de *C. albicans* quando associado a solução SDS a 0,25%. Neste mesmo estudo, quando o AM foi diluído em outros meios, como; água, PBS, NaCl e Uréia, não causou inativação microbiana em comparação ao grupo controle³³.

Em um outro estudo, foi percebido que, para a otimização da inativação, a utilização de uma maior ER seja imprescindível⁵⁵. Todavia, mesmo com aparelho de baixa I, o uso do SDS a 0,25% associado ao AM foi capaz de potencializar a ação TFD antimicrobiana, pelo fato de manter o controle da agregação^{33,34}.

Diante desse contexto, a justificativa do nosso estudo se refere principalmente em realizar uma comparação da dosimetria da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Candida albicans* utilizando azul de metileno veiculado em água e associado ao dodecilsulfato de sódio. Com base nestes estudos anteriores do grupo, e utilizando uma outra fonte de luz que permitia as alterações de I, partimos do menor valor de I disponível no equipamento (10%, equivalente a 3,7 mW/cm²) que era levemente maior que a usada anteriormente (2,6 mW/cm²) e procuramos iniciar as avaliações com uma ER próxima à utilizada anteriormente 4,4 J/cm²).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Comparar a dosimetria da terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de metileno veiculado em água e associado ao dodecilsulfato de Sódio (SDS) em cultura planctônica de *C. albicans*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a correlação entre a exposição radiante e ação antimicrobiana.
- Avaliar a correlação entre a irradiância e a ação antimicrobiana.

3. Material e Métodos

3.1. Preparo das Soluções

Foi preparado uma solução estoque do AM em água na concentração de 1,00 mg/mL. Para isso, foram pesados 10,0mg (AM) e diluídos em capela de fluxo laminar, em 10,0mL de água milli-Q estéril.

Para a solução estoque de SDS em água, na concentração de 0,5%, foram pesados 50mg de SDS e dissolvidos em 10,0mL de água milli-Q estéril, em capela de fluxo laminar.

A partir das soluções estoque, descritas anteriormente, foram realizadas diluições para obtenção das soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

AM água – 400µL da solução estoque de AM foram diluídos em 10mL de água milli-Q estéril, concentração de 4%.

AM SDS - 400µL da solução estoque de AM foram diluídos em 10mL de SDS a 0,5%.

As concentrações utilizadas neste projeto basearam-se em estudos prévios do grupo com o referido modelo experimental³³. Estas doses têm se mostrado eficazes no controle da agregação do Azul de Metíleno. Além disso, o uso de AM, quando empregado as concentrações descritas, elevou a eficácia da terapia³³.

3.2. Fonte de Luz e parâmetros de irradiação

Como fonte de luz nos experimentos foi utilizada a Ledbox (Biolâmbda, São Paulo, Brasil), cujos parâmetros estão especificados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros do equipamento LED.

| Parâmetros | Fonte/LED |
|--|-----------|
| Comprimento de onda Central (nm) | 660 |
| Largura Espectral (nm) | 20 |
| Modo de Operação | Continuo |
| Área irradiada (cm ²) | 163 |
| Irradiância máxima (mW/cm ²) | 37,3 |
| Potência máxima (mW) | 6080 |

Considerando que os parâmetros de irradiação foram variados, a Tabela 3 indica os parâmetros utilizados individualmente em cada experimento:

Tabela 3: Parâmetros testados no estudo.

| <u>IRRADIÂNCIA</u> | <u>IRRADIÂNCIA</u> | <u>IRRADIÂNCIA</u> | <u>IRRADIÂNCIA</u> |
|---|---|---|---|
| 3,7mW/cm ² - (10%) | 11,2mW/cm ² - (30%) | 18,6mW/cm ² - (50%) | 26,1mW/cm ² - (70%) |
| <u>EXPOSIÇÕES RADIANTES</u> | <u>EXPOSIÇÕES RADIANTES</u> | <u>EXPOSIÇÕES RADIANTES</u> | <u>EXPOSIÇÕES RADIANTES</u> |
| 4,4; 17,8; 26,7 e 44,0J/cm ² |
| <u>TEMPO</u> | <u>TEMPO</u> | <u>TEMPO</u> | <u>TEMPO</u> |
| 19 minutos e 49 segundos | 6 minutos e 37 segundos | 3 minutos e 57 segundos | 2 minutos e 48 segundos |
| 80 minutos e 11 segundos | 27 minutos | 15 minutos e 57 segundos | 11 minutos e 22 segundos |
| 120 minutos e 16 segundos | 39 minutos e 44 segundos | 23 minutos e 55 segundos | 17 minutos e 3 segundos |
| 198 minutos e 11 segundos | 65 minutos e 29 segundos | 39 minutos e 25 segundos | 28 minutos e 6 segundos |

| <u>Exposição Radiante</u> | <u>Exposição Radiante</u> | <u>Exposição Radiante</u> | <u>Exposição Radiante</u> |
|--|--|--|--|
| 4,4J/cm ² | 17,8J/cm ² | 26,7J/cm ² | 44,0J/cm ² |
| <u>POTÊNCIA DO EQUIPAMENTO</u> | <u>POTÊNCIA DO EQUIPAMENTO</u> | <u>POTÊNCIA DO EQUIPAMENTO</u> | <u>POTÊNCIA DO EQUIPAMENTO</u> |
| 3,7; 11,2; 18,6 e 26,1mW/cm ² |
| <u>TEMPO</u> | <u>TEMPO</u> | <u>TEMPO</u> | <u>TEMPO</u> |
| 19 minutos e 49 segundos | 80 minutos e 11 segundos | 120 minutos e 16 segundos | 198 minutos e 11 segundos |
| 6 minutos e 37 segundos | 27 minutos | 39 minutos e 44 segundos | 65 minutos e 29 segundos |
| 3 minutos e 57 segundos | 15 minutos e 57 segundos | 23 minutos e 55 segundos | 39 minutos e 25 segundos |
| 2 minutos e 48 segundos | 11 minutos e 22 segundos | 17 minutos e 3 segundos | 28 minutos e 6 segundos |

3.3 Preparo do Inóculo

A levedura *C. albicans* (ATCC 10231) foi cultivada em meio ágar sabouraud dextrose (KASVI) a 37°C, por 48h. Em capela de fluxo laminar, o microrganismo foi recolhido e transferido para um tubo de ensaio contendo 10mL de água MilliQ estéril. Foi realizado a agitação do tubo para homogeneização, após isso, foram retirados 20µL do inoculo e adicionados em tubo cônicoo contendo 1,5mL de água MilliQ estéril e 10µL de azul de tripan e feita uma nova homogeneização. Após esta etapa, foram retirados 10µL do inoculo para contagem em Câmara de Neubauer, padronizando-se a suspensão com 5×10^7 células/mL³³.

3.3. Avaliação do efeito da TFD com AM em diferentes Exposições radiantes

Em microplaca de 48 poços, foram adicionados 200µL da suspensão de *C. albicans* (5×10^7 células/mL) e 200µL da solução referente ao grupo tratamento. Os grupos foram divididos em:

Controle (CT) – Inoculo e água;

SDS – Inoculo e SDS, concentração final 0,25%;

AM – Inoculo e AM em água; concentração final 20mg/L

AM/SDS - Inoculo e AM em SDS, concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS.

As amostras foram homogeneizadas com pipeta e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 5 minutos. Após incubação, a placa foi irradiada (**com todos os grupos CT – SDS – AM – AM/SDS**) com I constante, variando o tempo (e consequentemente, a ER, a 4,4; 17,8, 26,7 e 44J/cm²) segundo apresentado na Tabela 3.

Foram realizados 4 grupos de experimentos, cada um deles em uma I fixa, são eles; 3,7mW/cm² (10% de potência do equipamento); 11,2 mW/cm² (30% de potência do equipamento); 18,6 mW/cm² (50% de potência do equipamento); 26,1 mW/cm² (70% de potência do equipamento).

Ao término da irradiação, foi retirada uma alíquota de cada amostra e realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}). Após este procedimento, 20µL de cada diluição foram semeados na forma de uma linha em placa de Petri contendo meio de cultura ágar sabouraud dextrose KASVI. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, e o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)

foram contados. O experimento foi realizado em triplicata e 3 experimentos independentes.

3.4. Avaliação do efeito da TFD com AM em diferentes Irradiâncias

Em microplaca de 48 poços, foram adicionados 200 μ L da suspensão de *C. albicans* (5×10^7 células/mL) e 200 μ L da solução referente ao grupo tratamento. Após incubação, a placa foi irradiada (**com todos os grupos CT – SDS – AM – AM/SDS**) com ER constante, variando o tempo (e a I (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1 mW/cm²), conforme apresentado na Tabela 3. Foram realizados 4 grupos de experimentos, cada um deles em uma ER fixa 4,4; 17,8, 26,7 e 44J/cm².

Ao término da irradiação, foi retirada uma alíquota de cada amostra que passou por diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}). Após este procedimento, 20 μ L de cada diluição foram semeados na forma de uma linha em placa de Petri contendo meio de cultura ágar sabouraud dextrose KASVI. As placas foram incubadas por 24h a 37°C, e o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram contados. Os experimentos foram realizados em triplicata e 3 experimentos independentes.

3.5. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Uma vez que foram utilizados os dados em Log UFC/mL considerou-se distribuição paramétrica, de forma que os mesmos foram expressos em valores de média e desvio padrão. Após, foram submetidos ao teste de análise de variância duas vias (Two-way ANOVA), seguido pelo pós teste de Bonferroni para comparação intergrupos e entre os diferentes tratamentos. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ($p < 0.05$).

Adicionalmente foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a correlação entre o efeito fotodinâmico antimicrobiano e os parâmetros utilizados.

4. Resultados:

4.1 Avaliação do efeito da TFD com AM em diferentes Exposições radiantes

4.1.1 Irradiância 3,7 mW/cm² (10% de potência do equipamento)

Na figura 7, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nos quais, foram avaliadas diferentes exposições radiantes (4,4; 17,8; 26,7 e 44J/cm²) que foram atingidas por meio da variação do tempo de irradiação (19 minutos e 49 segundos; 80 minutos e 11 segundos; 120 minutos e 16 segundos; 198 minutos e 11 segundos) respectivamente, utilizando a I de 3,7 mW/cm² e os 4 grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

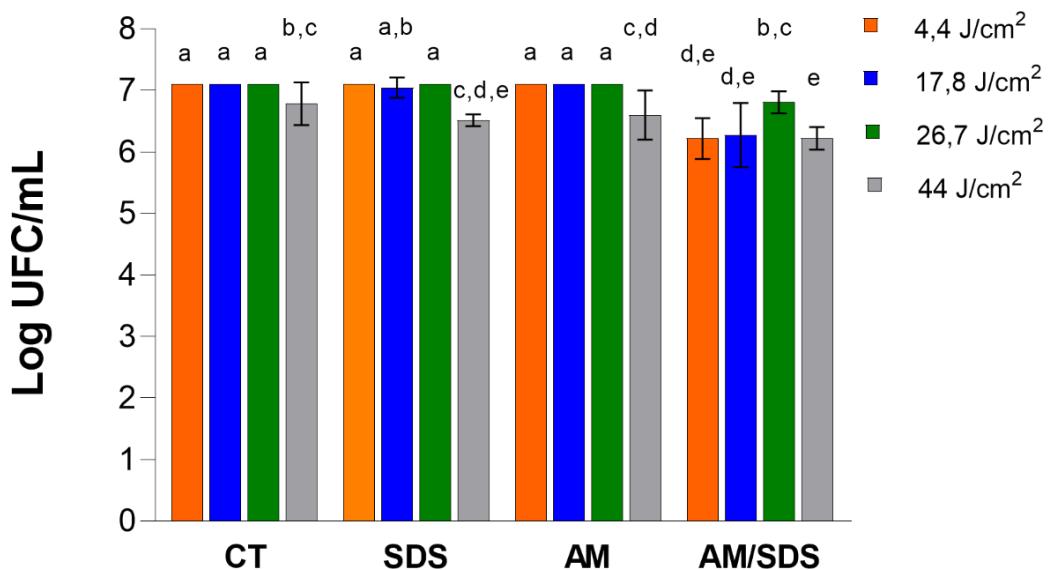


Figura 7: Mantendo a I de 3,7 mW/cm² (10%), variando a ER (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm²). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: **CT:** água estéril; **SDS:** SDS 0,25%; **AM:** AM 20mg/mL em água; **AM/SDS:** concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS (grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes p<0,05).

Nas exposições radiantes de 4,4; 17,8 e 26,7 J/cm² não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS e AM em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7. Na ER de 44 J/cm² houve redução de 0,6 nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS e AM em relação ao grupo CT. Esta redução está relacionada ao elevado tempo de irradiação (acima de 3h) no qual o inóculo estava presente em água.

Observa-se redução nos valores de log de UFC/mL no grupo AM/SDS em relação ao grupo CT nas exposições radiantes testadas: a 4,4; 17,8 e 44 J/cm² apresentaram redução de 0,9 log₁₀ de UFC/mL; 26,7 J/cm² apresentou uma redução de UFC/mL de 0,3 log₁₀.

Quando a comparação é realizada no grupo AM/SDS entre as diferentes exposições radiantes, todos os grupos mostraram redução significante dos valores de UFC/mL em relação a 26,7J/cm², apresentando uma redução de aproximadamente 0,6 log₁₀. Desta forma, a 3,7 mW/cm² não foi possível estabelecer correlação entre o aumento da ER e a morte celular (dados apresentados na tabela A1, apêndices) .

4.1.2 Irradiância 11,2 mW/cm² (30% de potência do equipamento)

Na figura 8, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nos quais foram avaliadas diferentes exposições radiantes (4,4; 17,8; 26,7 e 44J/cm²), que foram atingidas por meio da variação do tempo de irradiação (6 minutos e 37 segundos; 27 minutos; 39 minutos e 44 segundos; 65 minutos e 29 segundos), utilizando a I de 11,2 mW/cm² e os 4 grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

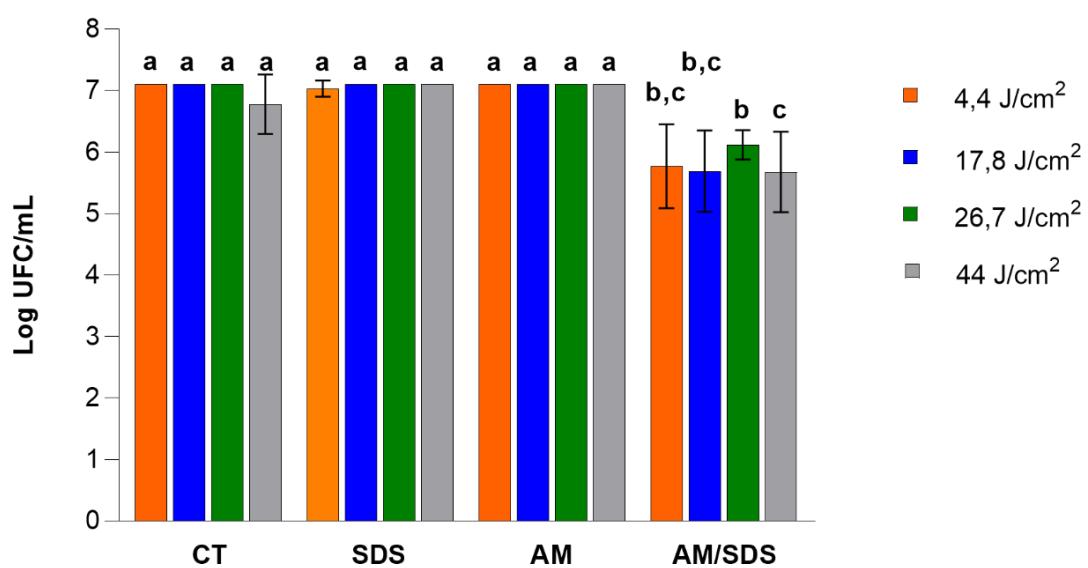


Figura 8: Mantendo a I de 11,2 mW/cm² (30%), variando a ER (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm²). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: **CT:** água estéril; **SDS:** SDS 0,25%; **AM:** AM 20mg/mL em água; **AM/SDS:** concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS (grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes p<0,05).

Em todas as exposições radiantes avaliadas não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS e AM em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7.

Nota-se redução de aproximadamente 1,5 no Log UFC/mL nas exposições radiantes de 3,7; 11,2 e 44 J/cm² no grupo AM/SDS quando comparado aos grupos CT, SDS e AM; e 1,0 Log UFC/mL na ERs de 26,7 J/cm². Quando a comparação é realizada no grupo AM/SDS entre as diferentes exposições radiantes, somente há diferença nos valores de UFC/mL entre 26,7 e 44 J/cm². Desta forma, a 11,2 mW/cm² não foi possível observar correlação entre o aumento da ER e a morte celular, conforme dados apresentados na Tabela A1 (apêndices).

4. 1.3 Irradiância 18,6 mW/cm² (50% de potência do equipamento)

Na figura 9, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nas quais, foram avaliadas diferentes exposições radiantes (4,4; 17,8; 26,7 e 44 J/cm²), que foram atingidas por meio da variação do tempo de irradiação (3 minutos e 57 segundos; 15 minutos e 57 segundos; 23 minutos e 55 segundos; 39 minutos e 25 segundos), utilizando I de 18,6 mW/cm² e os 4 grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

Na irradiância de 18,6 mW/cm² nota-se redução no valor de log UFC/mL a 44J/cm² em relação aos grupos CT das demais exposições radiantes testadas. Neste caso, essa redução se dá pelo efeito da luz na dosimetria utilizada. Em todas as exposições radiantes avaliadas não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS e AM em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7 para as menores ER. Na ER de 44 J/cm² houve redução de aproximadamente 0,7 nos valores de log UFC/mL nos grupos CT, SDS e AM em relação ao grupo CT das menores exposições radiantes (4,4; 17,8 e 26,7 J/cm²), não havendo diferença entre eles (CT, SDS e AM).

Nota-se redução de aproximadamente 1,5 log UFC/mL no grupo AM/SDS em relação aos demais grupos CT, SDS e AM, em todas as exposições radiantes avaliadas. Quando a comparação é realizada no grupo AM/SDS entre as diferentes exposições radiantes, não houve diferença entre os grupos. Desta

forma, a 18,6 mW/cm² não foi possível observar correlação entre o aumento da ER e a morte celular, conforme apresentado na Tabela A1 dos apêndices.

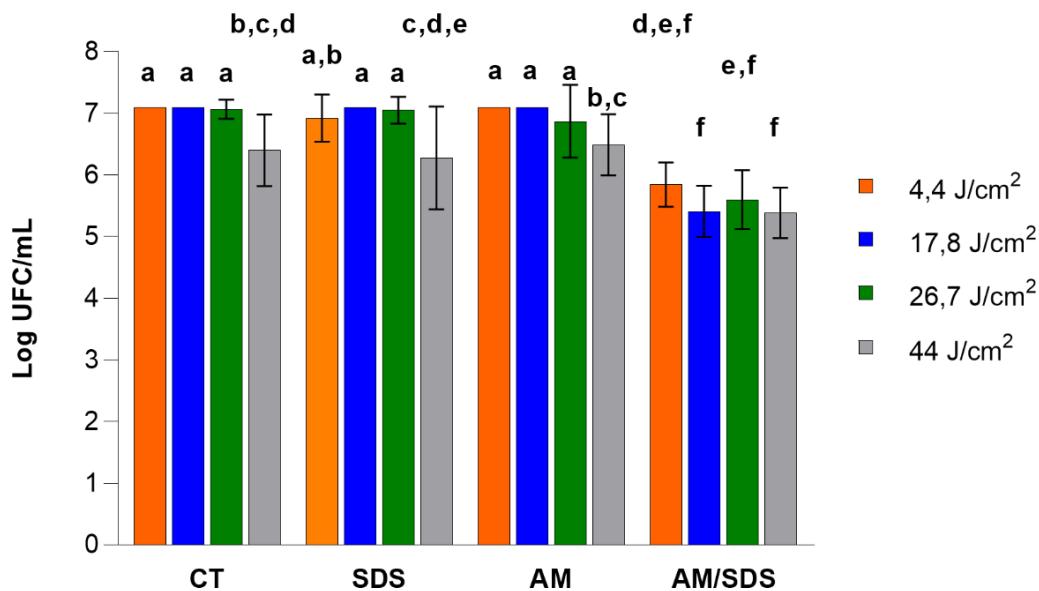


Figura 9: Mantendo a I de 18,6 mW/cm² (50%), variando a ER (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm²). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: **CT:** água estéril; **SDS:** SDS 0,25%; **AM:** AM 20mg/mL em água; **AM/SDS:** concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS (grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes p<0,05).

4.1.4 Irradiância 26,1 mW/cm² (70% de potência do equipamento)

Na figura 10, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nas quais, foram avaliadas diferentes exposições radiantes (4,4; 17,8; 26,7 e 44J/cm²), que foram atingidas por meio da variação do tempo de irradiação (2 minutos e 48 segundos; 11 minutos e 22 segundos; 17 minutos e 3 segundos; 28 minutos e 6 segundos), utilizando a I de 26,1 mW/cm² e os 4 grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

Nas exposições radiantes de 4,4; 17,8 e 26,7 J/cm² não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7. Na ER de 44 J/cm² houve redução de aproximadamente 1 nos valores de log UFC/mL nos grupo SDS em relação ao grupo CT.

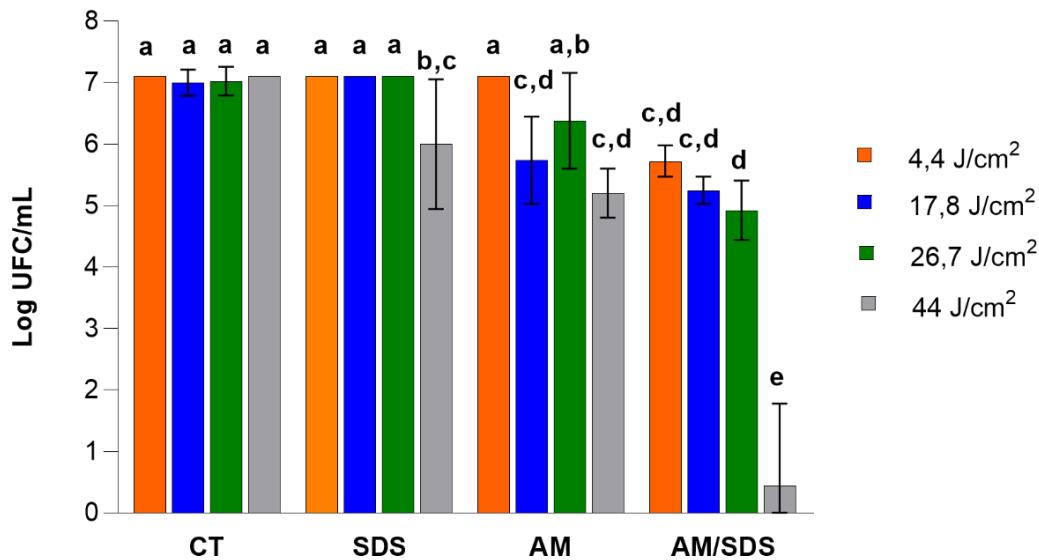


Figura 10: Mantendo a I de 26,1 mW/cm² (70%), variando a ER (4,4, 17,8, 26,7 e 44J/cm²). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: **CT**: água estéril; **SDS**: SDS 0,25%; **AM**: AM 20mg/mL em água; **AM/SDS**: concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS (grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes $p<0,05$).

No grupo AM, não foi observado efeito antimicrobiano nas ER de 4,4 e 26,7 J/cm², enquanto a 17,8 e 44J/cm² foi observada redução de 1,6 unidades nos valores de log UFC/mL.

Por fim, houve redução nos valores de log UFC/mL no grupo AM-SDS em relação ao grupo CT, AM e SDS em todas as ER avaliadas. Nesta I mais alta, foi possível notar correlação entre aumento da ER e aumento da morte de *C. albicans*. Neste caso, o valor do coeficiente de correlação de Pearson observado foi de -0,8357 (Tabela A1, apêndices), mostrando que foi observada uma correlação forte e negativa (isto é, enquanto uma aumenta a outra diminui) entre as variáveis ER e log UFC/mL.

4.2 Ensaios Mantendo a Exposição Radiante:

4.2.1 Exposição Radiante 4,4J/cm²

Na figura 11, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nos quais, foram avaliadas diferentes I (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1mW/cm²), obtidas por meio da variação da potência do aparelho (10, 30, 50 e 70%). Os tempos de irradiação foram variados para atingir a ER de 4,4 J/cm². Foram avaliados os 4 grupos de

tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

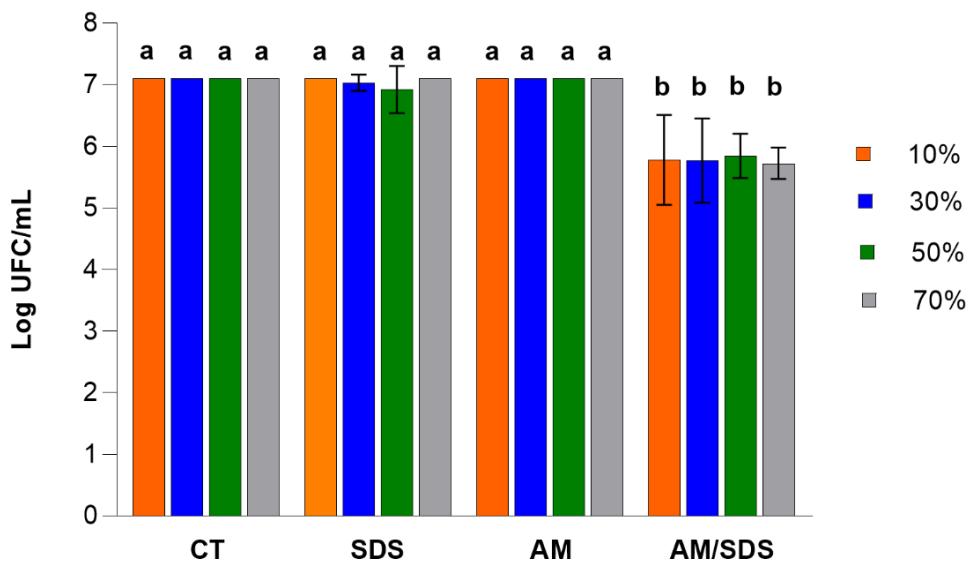


Figura 11: Mantendo a ER ($4,4\text{J/cm}^2$) e variando a I (3,7; 11,2; 18,6 e $26,1\text{mW/cm}^2$). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: CT: água estéril; SDS: SDS 0,25%. AM: AM 20mg/mL em água; **AM/SDS**: concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS. (grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes $p<0,05$)

Nota-se que em todas as potências de equipamento utilizadas (e portanto, nas diferentes I avaliadas) não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS e AM em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7. Houve redução de aproximadamente 1,5 nos valores de log UFC/mL apenas nos tratamentos AM/SDS em todos as I avaliadas, mostrando que o efeito da TFD é mais pronunciado neste grupo. Não se observa correlação entre a I utilizada e a morte celular, conforme dados apresentados na Tabela A2 dos apêndices.

4.2.2 Exposição Radiante $17,8\text{J/cm}^2$

Na figura 12, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nos quais, foram avaliadas diferentes Is (3,7; 11,2; 18,6 e $26,1\text{mW/cm}^2$), obtidas por meio da variação da potência do aparelho (10, 30, 50 e 70%). Os tempos de irradiação foram variados para atingir a ER de $17,8\text{J/cm}^2$. Foram avaliados os 4

grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

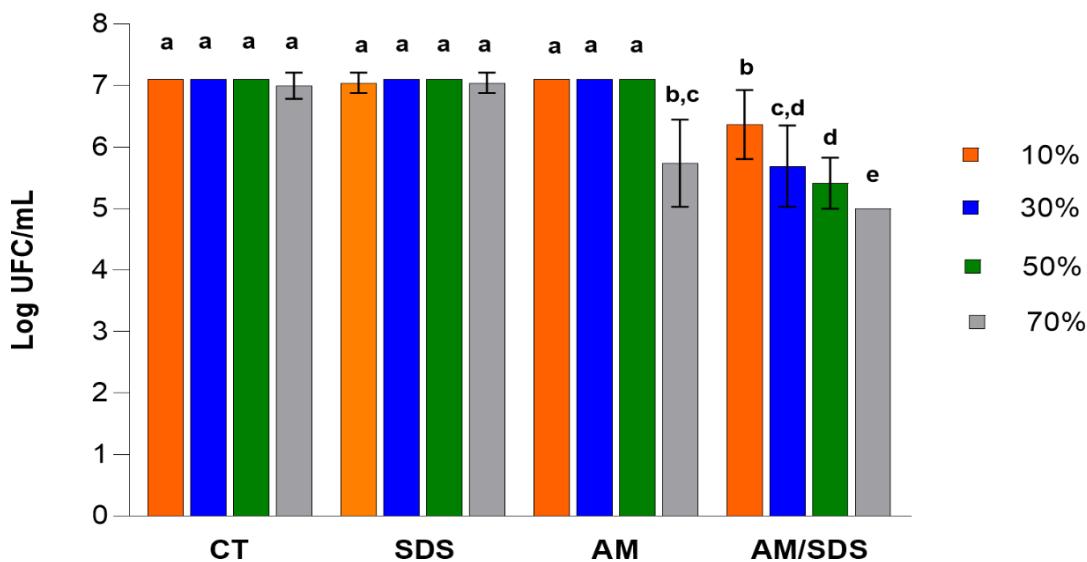


Figura 12: Mantendo a ER (17,8J/cm²) e variando a I (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1 mW/cm²). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: CT: água estéril; SDS: SDS 0,25%. AM: AM 20mg/mL em água; AM/SDS: concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS. (Grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes $p<0,05$)

Nota-se que em todas as potências de equipamento utilizadas (e portanto, nas diferentes Is avaliadas) não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7.

No grupo AM, também não houve alteração nos valores de log UFC/mL em relação ao grupo CT a 10%, 30% e 50% (3,7; 11,2 e 18,6 mW/cm², respectivamente) havendo redução de aproximadamente 1,1 Log UFC/mL apenas a 70% (26,1 mW/cm²).

Por fim, no grupo AM/SDS houve redução nos valores de log UFC/mL, proporcional à I utilizada, sendo maior a 70% (2,4), intermediária a 50% (1,7) e 30% (1,4) e menor a 10% (0,8). Desta forma, verifica-se que há correlação forte e negativa entre I e log UFC/mL, com um coeficiente de correlação de -0,7549 (Tabela A2, apêndices).

É importante ressaltar que o efeito antimicrobiano observado ao utilizar AM a 70% (26,1 mW/cm²) foi similar ao usar AM/SDS a 10% (3,7 mW/cm², respectivamente), ambos de aproximadamente 1 Log UFC/mL. Estes dados

mostram o potencial da associação de AM com SDS, sendo necessária menor dosimetria para a ação antimicrobiana.

4.2.3 Exposição Radiante 26,7J/cm²

Na figura 13, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nos quais, foram avaliadas diferentes I_s (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1mW/cm²), obtidas por meio da variação da potência do aparelho (10, 30, 50 e 70%). Os tempos de irradiação foram variados para atingir a ER de 26,7J/cm². Foram avaliados os 4 grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

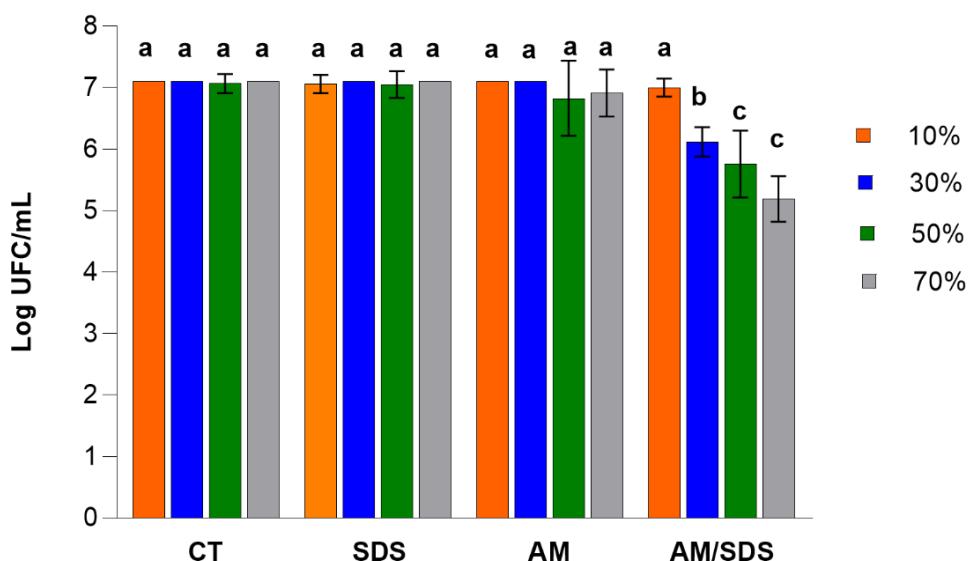


Figura 13: Mantendo a ER (26,7J/cm²) e variando a I (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1 mW/cm²). 10%, 30%, 50% e 70%) Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: CT: água estéril; SDS: SDS 0,25%. AM: AM 20mg/mL em água; AM/SDS: concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS. (grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes $p<0,05$)

Nota-se que em todas as potências de equipamento utilizadas (e portanto, nas diferentes I_s avaliadas) não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS e AM em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 7.

No grupo AM/SDS houve redução nos valores de log UFC/mL, proporcional à I utilizada, sendo que não foi observado efeito antimicrobiano a 10% (3,7 mW/cm²), redução de 1 Log de UFC/mL a 30% (11,2 mW/cm²), e

redução de aproximadamente 1,8 Log de UFC/mL a 50 e 70% (18,6 e 26,1 mW/cm², respectivamente), sendo estatisticamente iguais.

4.2.4 Exposição Radiante 44,0J/cm²

Na figura 14, estão apresentados os dados dos ensaios realizados, nos quais, foram avaliadas diferentes Is (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1mW/cm²), obtidas por meio da variação da potência do aparelho (10, 30, 50 e 70%). Os tempos de irradiação foram variados para atingir a ER de 44,0J/cm². Foram avaliados os 4 grupos de tratamento, conforme descrito no desenho experimental: Controle, SDS, AM e AM/SDS.

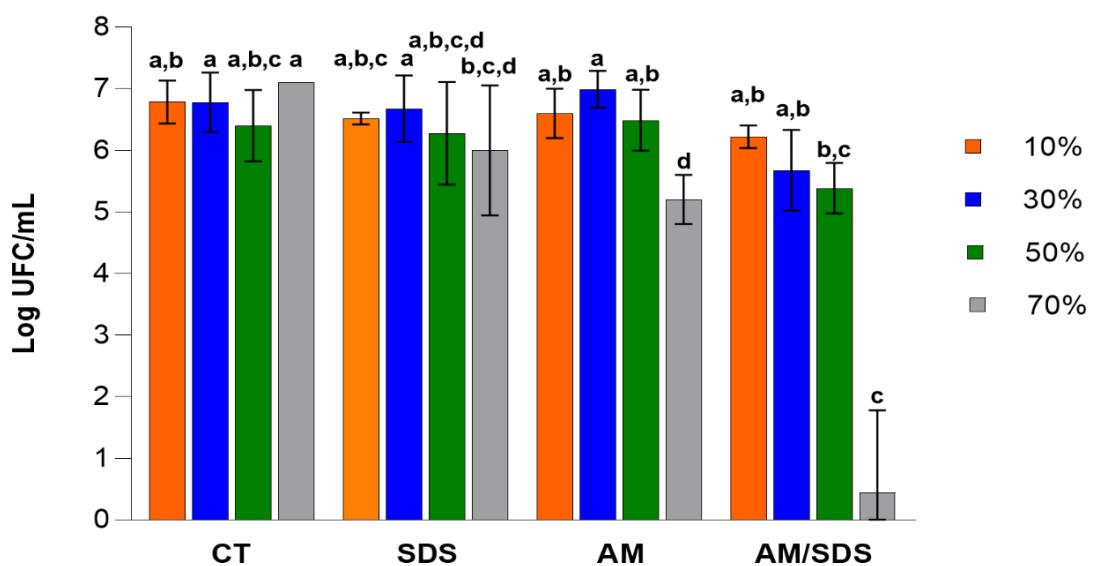


Figura 14: Mantendo a ER (44,0J/cm²) e variando a I (3,7; 11,2; 18,6 e 26,1 mW/cm²). Os inóculos foram tratados nas seguintes condições: CT: água estéril; SDS: SDS 0,25%. AM: AM 20mg/mL em água; AM/SDS: concentração final 20mg/L de AM e 0,25% SDS. (Grupos que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes p<0,05).

Nota-se que nas potências de equipamento de 10, 30 e 50% não houve alteração nos valores de log UFC/mL nos grupos SDS em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a 6,8. A 70% foi observada redução de aproximadamente 1 Log UFC/mL no grupo SDS, respectivamente, em relação ao grupo controle.

Efeito similar foi observado no grupo AM, não havendo alteração nos valores de log UFC/mL em relação ao grupo CT, sendo mantidos constantes a

6,8 quando utilizados 10, 30 ou 50%. Já a 70% foi observada redução de 1,9 Log UFC/mL em relação ao CT.

Por fim, no grupo AM/SDS não foi encontrada diferença nos valores de Log UFC/mL em relação ao grupo CT tanto quando foi utilizado 10%, a 30 % houve 1,4 de redução, a 50% houve redução de 1,7, enquanto que a 70% houve redução de 6,7 Log UFC/mL. Observa-se que houve correlação entre a I e o efeito antimicrobiano, sendo que o coeficiente de correlação de Pearson (-0,8180, Tabela A2 dos apêndices) mostrou correlação forte e negativa entre os valores de I e de log UFC/mL.

A 70% ($26,1\text{mW/cm}^2$) observa-se, portanto, efeito fotodinâmico tanto no grupo AM quanto no grupo AM-SDS, sendo que novamente foi possível verificar o potencial da associação visto que o efeito antimicrobiano, a uma mesma concentração de AM e dosimetria de luz, é muito maior na associação.

5 Discussão

Este trabalho visou avaliar a dosimetria da terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizando AM veiculado em água comparando ao AM associado ao SDS, visto que trabalhos anteriores do grupo mostraram maior efeito antimicrobiano nesta associação, porém em uma dosimetria fixa. Apesar desse efeito potencializado, não se sabe qual seria a dosimetria mínima necessária no caso da associação AM-SDS em relação ao uso do AM em água.

De forma geral, a literatura é bastante variada em termos dos parâmetros eficazes a serem aplicados na TFD com AM. Por exemplo, enquanto Queiroga e colaboradores⁵⁶ ativaram soluções do AM a 150 mg/L com I de 1000 mW/cm² e ER de 60 a 180 J/cm²; Sousa e colaboradores⁴⁹ utilizando a mesma concentração de AM, aplicaram I de 3,3 W/cm² e ER de 426 J/cm². Em contraponto Sabino e colaboradores⁴⁷ trabalharam com AM 100 µM (que equivale a 32 mg/mL) a 100 mW/cm², encontrando 3 Log de redução nas UFC/mL a 25 J/cm².

Os melhores parâmetros para maior efeito antimicrobiano da TFD depende de alguns fatores como a substância fotossensibilizadora utilizada⁵⁷, o meio no qual o FS está veiculado^{33,34} e a organização do microrganismo(s) como suspensão ou biofilme³³. Neste trabalho, o AM foi utilizado como agente fotossensibilizador, visto seu baixo custo e ampla gama de estudos desde *in vitro*, *in vitro* e clínicos com seu uso em TFD^{33,55,58–65}. Estes parâmetros foram determinados em suspensão para a associação entre AM e SDS, porém organizações microbianas mais complexas, como biofilmes, bem como, na utilização em pacientes, podem exigir dosimetrias maiores, sendo necessários estudos posteriores. Em termos do meio de veiculação, a escolha do mesmo é essencial visto que o AM apresenta a propriedade de metacromasia, havendo alteração das suas propriedades ópticas e fotoquímicas dependendo do ambiente químico no qual o mesmo está inserido⁶⁶. Alguns trabalhos já mostraram que na presença de algumas substâncias como etanol^{67,68}, uréia⁶⁹, SDS^{33,34} há o controle da agregação do AM o que melhoraria a ação antimicrobiana da TFD com AM. A agregação já foi objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa e, foi identificado que quando a agregação é controlada, a eficácia da TFD terapêutica aumenta³³. Porém estudos avaliando as dosimetrias nestes meios específicos ainda são inexistentes.

Neste trabalho verificamos que para uma mesma dosimetria (combinação de I e ER) o efeito antimicrobiano da TFD do AM associado ao SDS é sempre mais pronunciado do que do AM veiculado em água. Porém, a inativação do microrganismo (redução mínima de 3 Logs, que neste caso em específico foi de aproximadamente 6 Logs) foi alcançada no grupo AM-SDS somente a $26,1\text{mW/cm}^2$ e a 44 J/cm^2 . Sabino e colaboradores⁴⁷ atingiram 3 logs de redução utilizando 100mW/cm^2 (I 3,8 vezes maior do que a usada neste estudo) e 25 J/cm^2 (ER 1,8 vezes menor que a usada neste estudo). Vale ressaltar que a concentração de AM final utilizada neste trabalho foi de 20 mg/mL ou $0,002\%$, que é menos da metade da menor concentração dos produtos comercializados contendo AM e, em comparação com o trabalho de Sabino uma concentração 2,4 vezes menor.

Diante destes resultados é válido ressaltar a importância de mencionar o meio no qual o fotossensibilizador é veiculado nas publicações, especialmente para aqueles compostos que sofrem agregação, visto que dependendo do meio utilizado a dosimetria para efeito antimicrobiano eficaz é diferente. Queiroga e colaboradores utilizaram dosimetria muito maior que a relatada aqui (1000mW/cm^2 e $60\text{-}180\text{ J/cm}^2$), porém foi utilizado AM a 150mg/L e em solução salina, duas condições nas quais a agregação do AM é maior^{37,70} o que exigiria maiores dosimetrias para obter efeito antimicrobiano. Similarmente, Sousa e colaboradores obtiveram inativação de *C.albicans* utilizando AM a 150mg/L , também em soro fisiológico, utilizando 3300mW/cm^2 e 426 J/cm^2 . Similarmente, Prates *et al.*⁵⁵ avaliou o efeito antifúngico da TFD com AM aplicado em meio de cultivo, utilizou I de 100mW/cm^2 e 300mW/cm^2 em tempos de 3, 6 e 9 minutos de irradiação, condicionando à exposições radiantes de (18J/cm^2 a 162J/cm^2), atingindo a inativação a 6 e 9 minutos de irradiação a 300 mW/cm^2 (108 e 162 J/cm^2).

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que para uma mesma I, somente verifica-se aumento no efeito antimicrobiano em função do aumento da ER em I maiores, isto é, a $26,1\text{ mW/cm}^2$. Acredita-se que em baixas I a produção de espécies oxidativas provenientes da fotoativação do AM é baixa, de modo que as defesas antioxidantes do microrganismo são capazes de gerenciar até certo ponto o dano ocorrido. Além disso, quando uma I baixa é aplicada, há uma necessidade de elevado tempo de exposição, dificultando ou inviabilizando

translação para protocolos clínicos. Desta forma, nossos dados sugerem que não somente é uma aplicação inviável, mas também pouco eficaz.

Já em I maiores, há uma produção intensa e em curto período de tempo de espécies oxidantes, havendo um estresse oxidativo que leva o microrganismo à morte. Desta forma, acredita-se que há correlação entre ER e o efeito antimicrobiano, porém é necessária uma I mínima, que na prática clínica é um parâmetro equipamento dependente. Nossos dados corroboram com achados anteriores que mostraram que a dosimetria é um fator crítico para o efeito antimicrobiano da TFD⁵⁷. Este achado poderia induzir à escolha de lasers de baixa potência, ao invés dos LEDs, porém cada vez mais têm sido produzidos LEDs com maiores potências que podem facilmente suplantar este problema⁷¹⁻⁷³.

Por outro lado, há a preocupação no uso de equipamentos com elevados valores de I devido à possibilidade de causarem o fotobranqueamento do AM, diminuindo a eficácia da TFD. Maliszewska e colaboradores⁷⁴, utilizando um dispositivo LED caseiro a 640 nm, 2,5-10 mW/cm² irradiaram soluções de AM em água (em concentrações não relatadas) e notaram a existência de fotobranqueamento em uma cinética de segunda ordem.

Esta modulação relacionada à I na TFD se assemelha àquela postulada na lei de Arndt-Schulz referente à fotobiomodulação^{75,76}, isto é, há uma dosimetria sem efeito, uma dosimetria maior na qual obtém o efeito desejado e uma dosimetria ainda maior, onde efeitos inibitórios ou não desejados, passam a tomar parte.

Quando se compara o efeito de diferentes I em um mesmo parâmetro de ER, foi possível observar que apesar de na menor ER não haver correlação entre o efeito antimicrobiano (por meio dos valores de CFU/mL) e a irradiância, em todas as demais ER essa correlação existiu (Tabela A2, dos apêndices). Além disso, a 17,8 e 26,7 J/cm² a redução nos valores de Log UFC/mL foi linear enquanto a 44,0 J/cm² foi estabelecida uma regressão quadrática, de forma que o efeito antimicrobiano é ainda mais intenso com o aumento da irradiância (Figura A2, dos apêndices).

6 Conclusão

Este trabalho evidenciou:

- A associação do SDS com o AM apresenta maior efetividade da TFD quando realizada a comparação do AM em água em todas as dosimetrias avaliadas;
- A utilização do AM/SDS evidencia correlação entre Exposição Radiante e efeito antimicrobiano em irradiâncias acima de $26,1 \text{ mW/cm}^2$;
- A utilização do AM/SDS evidencia correlação entre Irradiância e o efeito antimicrobiano em Exposições Radiantes acima de $17,8 \text{ J/cm}^2$;
- O uso de equipamentos de baixa intensidade e a utilização de baixas exposições radiantes não são indicadas;
- O aumento da dosimetria está correlacionada à maior efetividade da terapia antimicrobiana;
- Não foram estabelecidos limites superiores quanto a estes parâmetros.

7. Correlação de Pearsons

Para avaliar a resposta antimicrobiana em função das exposições radiantes utilizadas, nos diferentes parâmetros de irradiação selecionados foram determinados os valores de coeficientes de correlação de Pearson (Tabela A1).

Tabela A1: Análise de correlação de Pearson entre o efeito antimicrobiano e a exposição radiante, nas diferentes irradiações.

| | Valor p | Coeficiente de Pearson |
|------|------------------------------|------------------------|
| 3,7 | 0,1031 | |
| 11,2 | 0,4320 | |
| 18,6 | 0,2804 | |
| 26,1 | 7,77x10⁻¹⁰ | -0,8357 |

Adicionalmente, foram utilizadas técnicas de regressão para estabelecer relações matemáticas entre o efeito fotodinâmico e a exposição radiante, nas irradiações utilizadas. Os gráficos representativos dos dados e funções matemáticas estabelecidas, além dos parâmetros determinados estão apresentados na **Figura A1**.

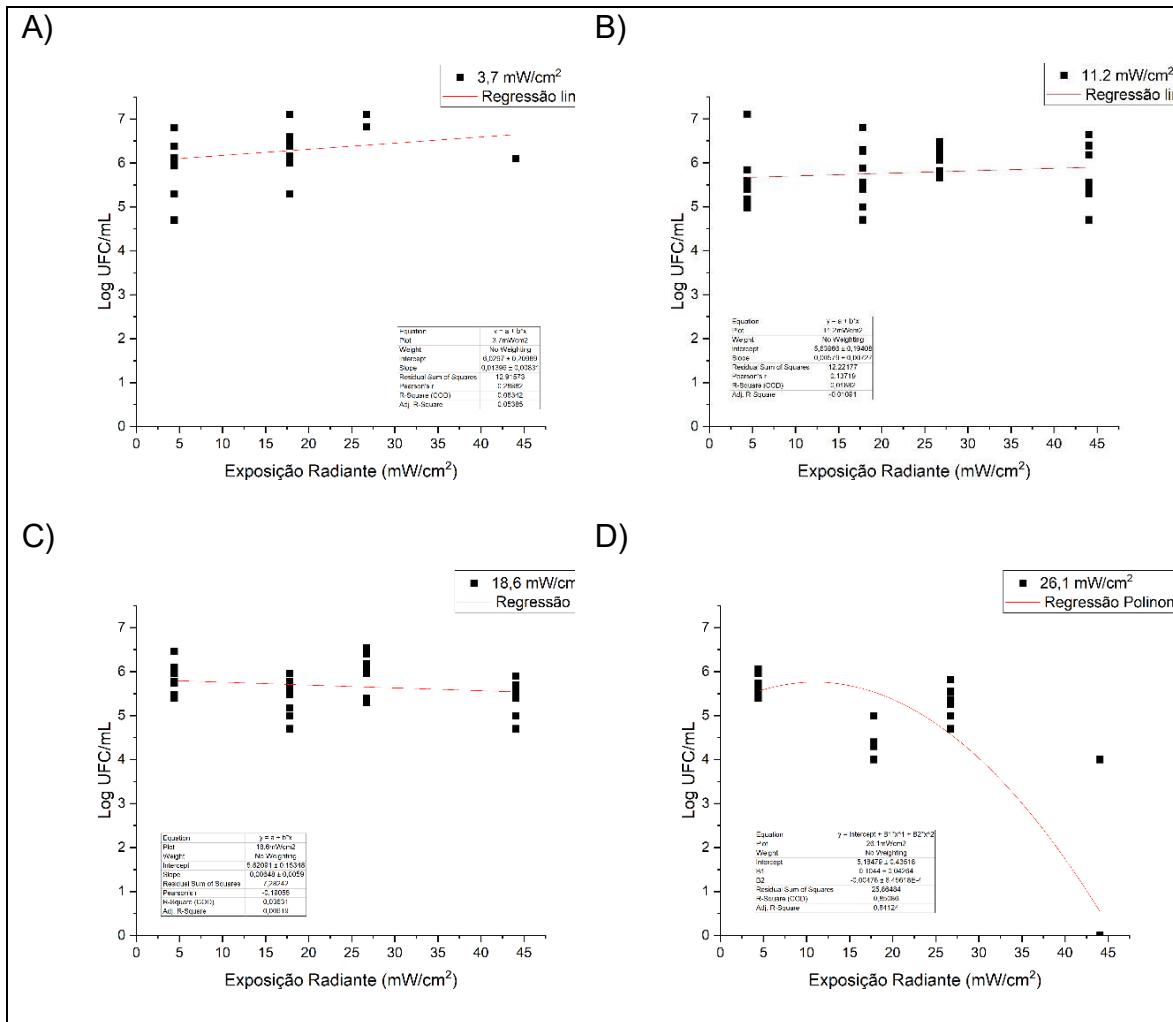


Figura A1: Regressão linear/polinomial para estabelecer relações matemáticas entre o efeito antimicrobiano e a exposição radiante, nas diferentes irradiâncias A) 3,7 mW/cm²; B) 11,2 mW/cm²; C) 18,6 mW/cm²; D) 26,1 mW/cm²

Para avaliar a resposta antimicrobiana em função das irradâncias utilizadas, nos diferentes parâmetros de exposição radiante selecionados foram determinados os valores de coeficientes de correlação de Pearson (Tabela A2).

Tabela A2: Análise de correlação de Pearson entre o efeito antimicrobiano e a irradância, nas diferentes exposições radiantes.

| Exposição Radiante (J/cm ²) | Valor p | Coeficiente de Pearson |
|---|------------------------------|------------------------|
| 4,4 | 0,8496 | |
| 17,8 | 2,77x10⁻⁷ | -0,7549 |
| 26,7 | 9,25x10⁻¹² | -0,8722 |
| 44,0 | 3,38x10⁻⁸ | -0,8180 |

Adicionalmente, foram utilizadas técnicas de regressão para estabelecer relações matemáticas entre o efeito fotodinâmico e a irradância, nas exposições radiantes utilizadas. Os gráficos representativos dos dados e funções matemáticas estabelecidas, além dos parâmetros determinados estão apresentados na Figura A2.

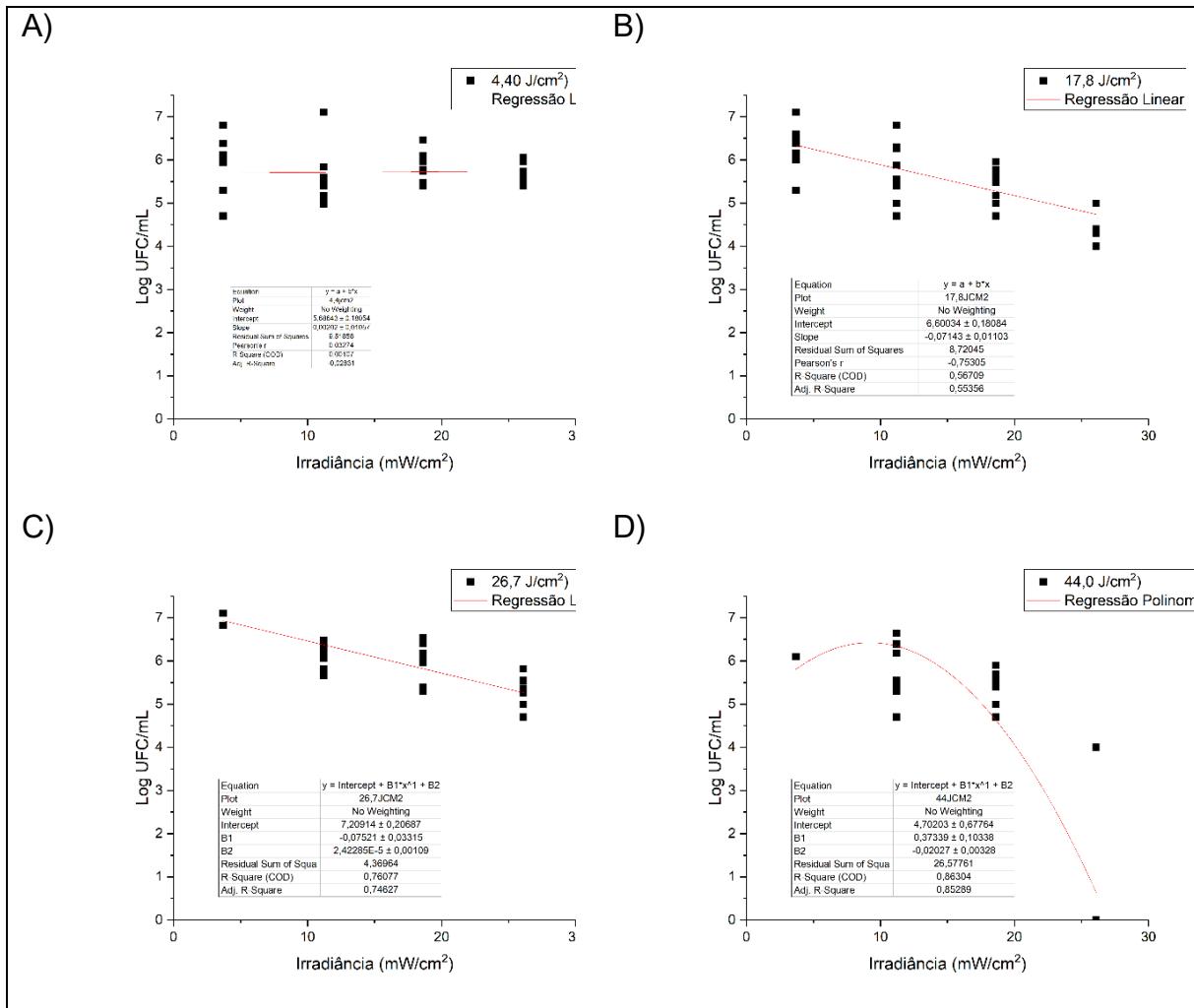


Figura A2: Regressão linear/polinomial para estabelecer relações matemáticas entre o efeito antimicrobiano e a irradiância, nas diferentes exposições radiantes A) $4,4 \text{ J/cm}^2$; B) $17,8 \text{ J/cm}^2$; C) $26,7 \text{ J/cm}^2$; D) $44,0 \text{ J/cm}^2$.

8. Referências

1. Zeinab Ghasemi, Famsatarian B, Salehi E, Sharifinia S, Barikani A, Mirzadeh M, et al. Relação entre perfil de suscetibilidade antifúngica e fatores de virulência em *Candida albicans* isoladas de espécimes de unhas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:1–8.
2. Candeló, Karen Daniela.; Cuartas María Alejandra.; PAZ, David Andrés.; Ruiz, Melibea Sierra.; Martínez, Luisa Fernanda.; Rosso, Fernando.; Pacheco R. MPA. Infección invasiva por *Candida* spp. En pacientes inmunocomprometidos: Descripción de curso clínico experiencia diagnóstica, manejo y seguimiento en centro de alta complejidad. Bogotá-Colômbia; 2020. p. 143–8.
3. Versão I, Rocha DAS. Anais da Academia Brasileira de Ciências Isolados clínicos de *Candida albicans* de um hospital terciário do sudoeste brasileiro exibem perfil de resistência a azóis mediado por MFS. 2020;1–8.
4. Perry AM, Hernday AD, Nobile CJ. Unraveling How *Candida albicans* Forms Sexual Biofilms. *J Fungi.* 2020;6(1):14.
5. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. Vol. 13, *Virulence.* 2022. p. 89–121.
6. Sonia Khouri , Luciana da Silva Ruiz , Marcos Ereno Auler , Bosco Christiano Maciel da Silva, Virgínia Bodelão Richini Pereira, Carina Domaneschi , Rosane Christine Hahn CRP. Avaliação de infecções por *Candida* em um hospital universitário da região do Vale do Paraíba. 2016. p. 2176–6223.
7. Dias IJ, Trajano ERIS, Castro RD, Ferreira GLS, Medeiros HCM, Gomes DQC. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. *Brazilian J Biol.* 2018;78(2):368–74.
8. Leite, Danielle Prado.; Piva, Marta Rabello.; Filho PRSM. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. 2015.
9. Vilar SM, Azevedo AC. Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar Probióticos em mulheres com candidíase Probiotics in women with vulvovaginal candidiasis : 2020;2–6.

10. Cassiana Aparecida Álvares; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski; Márcia Edilaine Lopes Consolaro. Candidíase vulvovaginal_ fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. 2007. p. 1–9.
11. Álvares, Cassiana Aparecida.; Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet.; Consolaro MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. Rio de Janeiro; p. 4–22.
12. Barbedo, Leonardo Silva.; Brito, Simone Cristina Pereira.; Kegel, Fabíola Cristina de Oliveira.; Cordeiro, Jânio Alves.; Oliveira, Jeferson Carvalhaes de.; Sgarbi DB da G. Etiologia dos casos de candidíase cutânea atendidos no serviço de micologia da Universidade Federal Fluminense, Brasil. Caracas-Venezuela; 2013. p. 9–842.
13. Dias MFRG, Quaresma-Santos MVP, Bernardes-Filho F, Amorim AG da F, Schechtman RC, Azulay DR. Update on therapy for superficial mycoses: review article part I. An Bras Dermatol. 2013;88(5):764–74.
14. Tong Y, Tang J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. Microbiol Res. 2017;198:27–35.
15. Khouri S, Ruiz L da S, Auler ME, Silva BCM da, Pereira VBR, Domaneschi C, et al. Evaluation of infections by *Candida* at a university hospital of Vale do Paraíba region, São Paulo State, Brazil: species distribution, colonization, risk factors and antifungal susceptibility. Rev Pan-Amazonica Saúde. 2016;7(2):51–7.
16. Giolo, Muriel Padovani.; Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. São Paulo; 2010. p. 225–34.
17. Analy Salles de Azevedo Melo; Rui Cosme Serafim; Marcelo Ribeiro da Silva Briones. Identification of genes differentially expressed in hyphae of *Candida albicans*. 2003. p. 1–5.
18. Wightman, Raymond .; Bates, Steven.; Amornrattanapan, Pat .; Sudbery P. In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization. 2004. p. 581–91.
19. Palma, Ana Luiza Rosário; Ramos, Lucas de Paula; Domingues, Nadia et al. Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis* and their Susceptibility to Antimicrobial Effects of Photodynamic inactivation. São Paulo; 2018. p. 28.

20. Mello, Debora L.; Malavolta, Juliana L.; Santos, Roberto CV.; Lopes, Leonardo QS.; mOURA, Sidnei.; Flores, Darlene C.; Flores AF. Síntese eficiente e atividades antimicrobianas de trifluorometil-1 H - pirazol-1-(tio) carboxamidas e trifluorometil-1 H pirazol - 1 -il - tiazóis de cadeia alquila longa. Santa Maria- RS: Revista da Sociedade Brasileira de Química; 2021. p. 900–11.
21. Campinho LCP, Santos SMV, Azevedo AC. Probiotics in women with vulvovaginal candidiasis: what is the evidence? Rev Port Med Geral e Fam. 2019;35(6):465–8.
22. Vieira, Ana Júlia Hoffmann.; Santos JI dos. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. p. 1–48.
23. Ana Elisa Rojas, Jorge Enrique Pérez, Johan Sebastián Hernández 2 3 YZ. Análise quantitativa da expressão de genes resistentes ao fluconazol em cepas de *Candida albicans* isoladas de idosos. 2020. p. 1–10.
24. Nunes, Emmanuel Borges ; Nunes, Natália Borges.; Monteiro, Julius Caesar Mendes Soares.; Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. 2011.
25. Pardis Haddadi, Badiee P. Efeito antifúngico da erva medicinal do gergelim sobre as espécies de *Candida*_ estudo original e mini-revisão. 2019. p. 6–12.
26. Nobre M de O, Nascente P da S, Meireles MC, Ferreiro L. DROGAS ANTIFÚNGICAS PARA PEQUENOS E GRANDES ANIMAIS. Ciência Rural. 2002;32(1):175–84.
27. CANDIDA 8 Composto impresso 3D Upconversion com aplicações multifuncionais para engenharia de tecidos e terapia fotodinâmica.
28. DE MELO W, AVCI P, DE OLIVEIRA M, GUPTA A, VECCHIO D, SAASIVAM M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(7):669–93.
29. SILVA, F. C. da, ROSA, L. P., PINHEIRO, A. L. B., KOGA-ITO, C. Y., ARAÚJO, B. P. de, VIANA, V. de O., & CAMPOS LANL. Effectiveness of photodynamic therapy on *Candida* species isolated from oral samples of

- children exposed and not exposed to HIV. 2016. p. 271–9.
30. Oliveira BP de, Lins, Carla Cabral dos Santos Accioly Diniz FA, Melo LL, Castro CMMB de. In Vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. *Brazilian J Oral Sci.* 2014;13(1):53–7.
 31. Sousa V 1 , Gomes ATPC 1 , Freitas A 2 , Faustino MAF 3 , Neves MGPMS 3 AA 1 . Inativação fotodinâmica de *Candida albicans* no plasma sanguíneo e no sangue total. 2019. p. 4.
 32. Miranda C, Francisco L, Miranda C, Francisco L. Avaliação de fotossensibilizadores fenotiazínicos para Terapia Fotodinâmica. 2016.
 33. Da Collina GA, Freire F, Santos TP da C, Sobrinho NG, Aquino S, Prates RA, et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2018;17(10):1355–64.
 34. Collina GA, Freire F, da Silva Barbosa V, Bento Correa C, Reis Nascimento H, Ratto Tempestini Horliana ACAC, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic *Candida albicans* is increased in sodium dodecyl sulfate. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2020;29(November 2019):101612. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101612>
 35. Suzuki LC, Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Yoshimura TM, Silva TO, et al. Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;17:173–9.
 36. 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):1525–32.
 37. Francisco CML, Gonçalves JMLA, Brum BS, Santos TPC, Santos-Franco AL-, Silva DF., et al. Phenothiazine photodynamic efficiency is aggregation dependent. *New J Chem.* 2017;41:14438–43.
 38. Bergmann K, O'Konski CT. A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer, and Complexes With Montmorillonite. *J Phys Chem.* 1963;67(10):2169–77.
 39. Junqueira HCC, Severino D, Dias LGG, Gugliotti MSS, Baptista MSS. Modulation of methylene blue photochemical properties based on

- adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys.* 2002;4(11):2320–8.
40. Junqueira HC. Síntese e estudo das propriedades fotoinduzidas de derivados fenotiazínicos em sistemas biomiméticos. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2008.
 41. Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci.* 1999;14:150–7.
 42. M. C. Andrade, A. P. D. Ribeiro LND et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. São Paulo; 2013. p. 200–10.
 43. Dai T, Bil De Arce VJ, Tegos GP, Hamblin MR. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5710–7.
 44. Daliri F, Azizi A, Goudarzi M, Lawaf S, Rahimi A. In vitro comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene blue on *Candida albicans* colonies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:193–8.
 45. Moreira LM, Lyon JP, Romani AP, Severino D, Rodrigues MR, de Oliveira HPM. Phenotiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms. *Adv Asp Spectrosc.* 2012;393–422.
 46. Pupo YM, Gomes GM, Santos EB, Chaves L, Michel MD, Kozlowski-Jr VA, et al. Susceptibility Of *Candida Albicans* To Photodynamic Therapy Using Methylene Blue And Toluidine Blue As Photosensitizing Dyes. *Acta Odontol Lat.* 2011;24(2):188–92.
 47. Sabino CP, Wainwright M, dos Anjos C, Sellera FP, Baptista MS, Lincopan N, et al. Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2019;28(July):186–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.022>
 48. SILVA FC da, ROSA LP, PINHEIRO ALB, KOGA-ITO CY, ARAÚJO BP de,

- VIANA V de O, et al. Effectiveness of photodynamic therapy on *Candida* species isolated from oral samples of children exposed and not exposed to HIV. RGO - Rev Gaúcha Odontol. 2016;64(3):271–9.
49. SOUSA JNL de, QUEIROGA BH de, KOCERGINSKY P de O, MARINHO PHC, ARAKI ÂT. Photoinactivation of *Candida albicans* using methylene blue as photosensitizer. RGO - Rev Gaúcha Odontol. 2015;63(4):411–7.
50. Fernandes KPS, França CM, Mesquita-Ferrari RA. Biofotônica: conceitos e aplicações. 1st ed. Storopoli E, Storopoli Maria Cristina Barbosa, Miranda GP, Gutierrez DCC, Mafhuz GR, editors. São Paulo; 2017. 258 p.
51. Alvarenga H, Letícia; Gomes Carolina, Ana; Carribeiro, Pamela et al. Parâmetros para terapia fotodinâmica antimicrobiana em bolsa periodontal - ensaio clínico randomizado. São Paulo; 2019. p. 132–6.
52. Francisco CML, Gonçalves JMLA, Brum BS, Santos TPC, Lino-Dos-Santos-Franco A, Silva DFT, et al. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. New J Chem. 2017;41(23):14438–43.
53. Ma J, Shi H, Sun H, Li J, Bai Y. Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;27(June):280–7.
54. de Oliveira-Silva T, Alvarenga LH, Lima-Leal C, Godoy-Miranda B, Carribeiro P, Suzuki LC, et al. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on *Candida albicans* In The Presence of Glucose. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;27:54–8.
55. Prates RA, Silva EG, Yamada AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS, et al. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. Laser Phys [Internet]. 2009;19(5):1038–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1054660X09050284>
56. Queiroga AS, Trajano VN, Lima EO, Ferreira AFM, Queiroga AS, Limeira FA. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. by different doses of low power laser light. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2011;8(4):332–6.
57. Taraszkiewicz A, Szewczyk G, Sarna T, Bielawski KP, Nakonieczna J. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* with imidazoacridinones: Influence of irradiance, photosensitizer uptake and reactive oxygen species

- generation. *PLoS One*. 2015;10(6):1–19.
- 58. Belotto RA, Chavantes MC, Tardivo JP, Euzébio dos Santos R, Fernandes RCM, Horliana ACRT, et al. Therapeutic comparison between treatments for Vulvar Lichen Sclerosus: Study protocol of a randomized prospective and controlled trial. *BMC Womens Health*. 2017;17(1).
 - 59. Baptista MS, Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Brazilian J Med Biol Res*. 2011;44(1):1–10.
 - 60. Prates RA, Silva EG, Yamada AM, Suzuki LC, Paula CR, Ribeiro MS. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner. *Laser Phys* [Internet]. 2009;19(5):1038–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1054660X09050284>
 - 61. Briggs T, Blunn G, Hislop S, Ramalhete R, Bagley C, McKenna D, et al. Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections. *Lasers Med Sci*. 2018;
 - 62. Ogasawara K. Candida albicans Sterilization Using a Light-Emitting Diode and Methylene Blue. *Laser Ther*. 2018;27(4):257–63.
 - 63. Da Collina GA, Tempestini-Horliana ACR, da Silva DFT, Longo PL, Makabe MLF, Pavani C. Oral hygiene in intensive care unit patients with photodynamic therapy: Study protocol for randomised controlled trial. *Trials*. 2017;18(1).
 - 64. Silva ZS, Huang Y-Y, de Freitas LF, França CM, Botta SB, Ana PA, et al. Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against Streptococcus mutans biofilms. *Sci Rep*. 2016 Sep;6:33270.
 - 65. Schalch TO, Palmieri M, Longo PL, Braz-Silva PH, Tortamano IP, Michel-Crosato E, et al. Evaluation of photodynamic therapy in pericoronitis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(17):e15312.
 - 66. Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti MS, Baptista MS. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys*. 2002;4(11):2320–8.
 - 67. Prochnow EP, Martins MR, Campagnolo CB, Santos RC, Villetti MA, Kantorski KZ. Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic

- photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:291–6.
68. Filipini SMR, Campagnolo CB, Dutra DAM, Maciel RM, Danesi CC, Kantorski KZ. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in experimental periodontitis in diabetic rats: short-term results. *Lasers Med Sci.* 2019;34(6):1253–60.
69. Nuñez SC, Yoshimura TM, Ribeiro MS, Junqueira HC, Maciel C, Coutinho- Neto MD, et al. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2015;150(Set):31–7.
70. da Collina GA, Freire F, Santos TP da C, Sobrinho NG, Aquino S, Prates RA, et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2018;17(10):1355–64.
71. Cai JH, Tian QS, Zhu XZ, Qu ZH, He W, Zhou DY, et al. Robust Laminated Anode with an Ultrathin Titanium Nitride Layer for High-Efficiency Top- Emitting Organic Light-Emitting Diodes. *Molecules.* 2022;27(17).
72. Liu H, Fu Y, Tang BZ, Zhao Z. All-fluorescence white organic light-emitting diodes with record-beating power efficiencies over 130 lm W⁻¹ and small roll-offs. *Nat Commun.* 2022;13(1).
73. Hua J, Li J, Zhan Z, Chai Y, Cheng Z, Li P, et al. High efficiency and low operating voltage yellow phosphorescent organic light-emitting diodes with a simple doping-free structure. *RSC Adv.* 2022;12(34):21932–9.
74. Irena Maliszewska, Wanarska E, Thompson AC, Samuel IDW, Matczyszyn K. Biogenic Gold Nanoparticles Decrease Methylene Blue Photobleaching and Enhance Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules.* 2011;357– 75.
75. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level lightherapy. *Dose-Response.* 2009;7(4):358–83.
76. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, et al. Photodynamic therapy using intra-articular photofrin for murine MRSA arthritis: Biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. *Lasers Surg Med.* 2011;43(3):221–9.