



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

Gabriela Benedito Machado

**Terapia Fotodinâmica com fenotiazínicos
associados ao dodecil sulfato de sódio em biofilmes de
Candida albicans nas diferentes fases de crescimento**

**SÃO PAULO, SP
2023**

GABRIELA BENEDITO MACHADO

Terapia Fotodinâmica com fenotiazínicos associados ao dodecil sulfato de sódio em biofilmes de *Candida albicans* nas diferentes fases de crescimento

Tese apresentada à
Universidade Nove de Julho, como
pré-requisito para obtenção do
título de Doutora em Biofotônica
aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pavani

SÃO PAULO, SP

2023

FICHA CATALOGRAFICA

Machado, Gabriela Benedito.

Terapia fotodinâmica com fenotiazínicos associados ao dodecil sulfato de sódio em biofilmes de *Candida albicans* nas diferentes fases de crescimento. / Gabriela Benedito Machado. 2023.

78 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

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

1. Fotoquimioterapia. 2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 3. Biofilme. 4. *Candida albicans*. 5. Dodecilsulfato de sódio.
I. Pavani, Christiane. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 28 de fevereiro de 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Gabriela Benedito Machado

Título da Tese: “Terapia fotodinâmica com fenotiazínicos associados ao dodecil sulfato de sódio em biofilmes de cândida albicans nas diferentes fases de crescimento”.

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



Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES



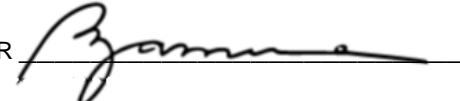
Membro: PROF^a. DR^a. SILVIA CRISTINA NUNEZ



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



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



Dedicatória

Dedico todas as realizações aos meus pais Penha e Rogerio, por todo amor, dedicação e valores dedicados à sua família.

Dedico esta conquista a todos meus ancestrais, que emanam energia e força para continuar a minha caminhada, quando subo um degrau na vida eles estão ao meu lado, Àsé

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Primeiramente a Deus, por nunca me abandonar e me mostrar o caminho que devo seguir, mesmo nos momentos mais difíceis dessa jornada não me abandonou.

A minha família, por me acolher e compreender meus momentos. A vitória não é somente minha, faz parte da história de vocês também.

A minha mãe, pelo amor dedicado

A orientadora por todo o auxílio, cada ensino foi essencial na minha vida, a cada palavra de apoio, cada reunião por todos os momentos de aprendizado ao seu lado.

Aos alunos de Iniciação por todo auxílio e troca de conhecimentos.

Aos colegas de mestrado e doutorado, pela amizade

A Lucia Maria (minha gata), pelo apoio emocional e por passar as madrugadas acordada ao meu lado.

Aos meus ancestrais pela força e coragem.

RESUMO

A capacidade de organização em biofilmes é essencial para infecção do hospedeiro e virulência de *C. albicans*. A organização em biofilmes confere maior resistência aos antifúngicos de forma que terapias de combate aos biofilmes são essenciais no controle das infecções na área da saúde. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) baseia-se na utilização de um fotossensibilizador (FS) ativado pela luz com parâmetros adequados, levando à morte das células-alvo. O azul de metileno (AM) é um FS bastante estudado na aPDT, porém existem compostos de estrutura similar, todos pertencentes à classe dos fenotiazínicos, cujos efeitos ainda não são conhecidos, entre eles Azure A (AA), Azure B (AB) e dimetil azul de metileno (DMAM). Sabe-se que estes FSs apresentam agregação que pode ser minimizada em alguns meios/solventes, de forma a potencializar os efeitos da aPDT. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da aPDT com compostos fenotiazínicos na eficácia da aPDT em biofilmes, nas suas diferentes etapas de formação. Após o cultivo, foi preparada uma suspensão de *C. albicans*, seguida de plaqueamento (5.0×10^7 células/mL). Um conjunto de experimentos foi realizado com o tratamento das suspensões e avaliação de sua capacidade de formar biofilmes, enquanto outros conjuntos foram realizados em biofilmes já estabelecidos. Para formação dos biofilmes, a suspensão preparada foi incubada, na presença de meio caldo Sabouraud. As amostras foram expostas às soluções FS (em água ou na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,25%) sendo mantidos por 5 minutos no escuro. A irradiação foi realizada e após os tratamentos, as soluções foram removidas, os biofilmes foram lavados com PBS para realização do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Os parâmetros do LED foram de 660nm, 37,3mW/cm² por 27 minutos, 60,4J/cm². Na avaliação do efeito da aPDT antes da fase da formação em biofilmes (antes da aderência), verificou-se que a aPDT com todos os FS estudados impede a formação do biofilme. A aPDT com quaisquer dos FS utilizados foi incapaz de reduzir a quantidade de UFC/mL tanto em biofilmes maduros (24h) quanto nos biofilmes em fase de dispersão (48h). Ao aplicar duas irradiações nos biofilmes em dispersão, verificou- se que aPDT com AM, AA e DMAM foram capazes de inativar a quantidade de UFC/mL, o mesmo não foi observado em biofilmes maduros. Diante disto, concluímos que as diferentes fases de crescimento do biofilme respondem à aPDT de forma diferente, sendo o maior efeito inibitório na fase de adesão. Os biofilmes maduros e em dispersão são menos susceptíveis à aPDT porém, o uso de duas sessões sequenciais é adequado para inativar o biofilme de *C. albicans*.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, Terapia Fotodinâmica antimicrobiana, Biofilme, *Candida albicans*, Dodecilsulfato de sódio.

ABSTRACT

The ability to organize into biofilms is essential for host infection and virulence of *C. albicans*. The organization in biofilms confers greater resistance to antifungals, so that therapies to combat biofilms are essential in the control of infections in the health area. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is based on the use of a photosensitizer (PS) activated by light with adequate parameters, leading to the death of target cells. Methylene blue (AM) is a SF that has been extensively studied in aPDT, but there are compounds with a similar structure, all belonging to the phenothiazine class, whose effects are not yet known, including Azure A (AA), Azure B (AB) and methylene dimethyl blue (DMAM). It is known that these FSs present aggregation that can be minimized in some media/solvents, in order to potentiate the effects of aPDT. Thus, the objective of this work is to evaluate the effect of aPDT with phenothiazine compounds on the effectiveness of aPDT in biofilms, in their different stages of formation. After cultivation, a suspension of *C. albicans* was prepared, followed by plating (5.0×10^7 cells/mL). One set of experiments was carried out with the treatment of suspensions and evaluation of their ability to form biofilms, while other sets were carried out on already established biofilms. For the formation of biofilms, the prepared suspension was incubated in the presence of Sabouraud broth medium. The samples were exposed to FS solutions (in water or in the presence of 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)) and kept for 5 minutes in the dark. Irradiation was performed and after the treatments, the solutions were removed, the biofilms were washed with PBS to perform the colony forming unit count assay (CFU/mL). LED parameters were 660nm, 37.3mW/cm² for 27 minutes, 60.4J/cm². In the evaluation of the effect of aPDT before the biofilm formation phase (before adherence), it was verified that aPDT with all the PS studied prevents the formation of the biofilm. aPDT with any of the FS used was unable to reduce the amount of CFU/mL both in mature biofilms (24h) and in biofilms in the dispersion phase (48h). When applying two irradiations to biofilms in dispersion, it was verified that aPDT with AM, AA and DMAM were able to inactivate the amount of CFU/mL, which was not observed in mature biofilms. In view of this, we conclude that the different stages of biofilm growth respond to aPDT differently, with the greatest inhibitory effect being in the adhesion stage. Mature and dispersing biofilms are less susceptible to aPDT, however, the use of two sequential sessions is adequate to inactivate the *C. albicans* biofilm.

Keywords: Photochemotherapy, Antimicrobial Photodynamic Therapy, Biofilm, *Candida albicans*, Sodium dodecyl sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Apresentações morfológicas e formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>.	26
Figura 2: Diagrama de Jablonski.	29
Figura 3: Estrutura química dos fotossensibilizadores.	33
Figura 4: Espectros de absorção do monômero (azul) e dímero (vermelho) do azul de metileno	38
Figura 5: Grupos experimentais do estudo.	44
Figura 6: Desenho do estudo.	44
Figura 7: Metodologia do ensaio em suspensão.	47
Figura 8: Ensaio unidades formadora de colônias.	48
Figura 9: Metodologias dos ensaios de aPDT em Biofilme nos estágios de maturação e dispersão.	50
Figura 10: Metodologias dos ensaios de duas irradiações de aPDT em Biofilme nos estágios de maturação e dispersão.	52
Figura 11: Avaliação do efeito dos fotossensibilizadores com AM, AA, AB e DMAM em suspensão antes da adesão no escuro.	54
Figura 12: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em suspensão antes da adesão.	55
Figura 13: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em biofilme na fase de maturação.	57
Figura 14: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em biofilme na fase de maturação com duas irradiações.	58
Figura 15: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em inativação de biofilme por aPDT na fase de dispersão.	60
Figura 16: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão com duas irradiações.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados bibliográficos sobre uso aPDT em Candida com fenotiazínicos.....	39
Tabela 2: Parâmetros dosimétricos LED para aplicação única de aPDT.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Azure A

AB - Azure B

ALA - ácido 5-aminolevulínico

AM - Azul de Metíleno

ATCC- American Type Culture Collection

CT - Controle

DMAM – Dimetil de azul de metíleno

ER – Exposição radiante

Força G – Força gravitacional

FS - Fotossensibilizador

FSS – Fotossensibilizadores

IUPAC - do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*, União
Internacional de Química Pura e Aplicada

LED - Diodo emissor de luz

Log – Logaritmo

PBS - do inglês *Phosphate Buffer Saline*, Tampão fosfato salino

aPDT – do inglês *antimicrobial Photodynamic Therapy*, Terapia fotodinâmica
antimicrobiana

pH – Potencial hidrogeniônico

RPM – Rotação por minuto

SDS - do inglês *sodium dodecyl sulfate*, Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

Tirr – Tempo de irradiação

UFC - Unidade Formadora De Colônia

Lista de unidades de medidas e símbolos

μL – microlitro

cm^2 - centímetro quadrado

h - Hora

J - Joules

L - Litro

min - minutos

mg - miligrama

mL - mililitro

mW - miliwatts

nm - nanômetro

$^{\circ}\text{C}$ – grau centígrado

s - Segundos

W - Watts

λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRAFICA	12
AGRADECIMENTOS	15
RESUMO.....	16
LISTA DE FIGURAS	18
LISTA DE ABREVIATURAS	20
Lista de unidades de medidas e símbolos	21
1. Introdução	24
1.1 Candida.....	24
1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)	28
1.2.1 LEDs como fontes de luz na aPDT	30
1.2.2 Fotossensibilizadores (FS)	31
2. Objetivos.....	42
2.1 Objetivos Gerais.....	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3. Materiais e Métodos	43
3.1. Materiais.....	43
3.2. Desenho experimental	43
3.3 Preparo das soluções.....	45
3.4. Preparação de suspensão	46
3.5 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM antes da fase de adesão de biofilmes (suspensão).....	46
3.5.1 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)	47
3.6 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme na fase de maturação (24 horas)	48
3.7 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme fase de dispersão (48h).....	49

3.8 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de maturação com duas irradiações.....	50
3.9 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão com duas irradiações.....	50
3.10 Análise estatística	52
4. Resultados.....	53
4.1 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM antes da fase de adesão de biofilmes (suspensão).....	53
4.2 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme na fase de maturação.....	56
4.3 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme na fase de maturação com duas irradiações.....	57
4.4 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão	59
4.5 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão com duas irradiações	60
5. Discussão	63
6. Conclusões.....	70
7. Referências	71

1. Introdução

1.1 *Candida*

Candida albicans é um fungo polimórfico oportunista que está presente como membro da microbiota humana saudável, colonizando de forma assintomática o trato gastrointestinal, trato reprodutivo feminino, cavidade oral e pele^{1,2}. Na maioria dos indivíduos com um sistema imunológico saudável, é inofensivo e sobrevive em harmonia com outros membros da microbiota humana. Porém, distúrbios que afetam esta harmonia como por exemplo variações no ambiente local (mudanças de pH ou mudanças nutricionais), uso de antibióticos, alterações no sistema imunológico (causadas por uma infecção, alterações imunológicas e terapia imunossupressora) podem permitir que *C. albicans* se prolifere rapidamente e cause infecção³.

C. albicans é considerado um fungo bifásico, apresentando-se em formas de leveduras na membrana mucosa ou na superfície da pele, e em forma filamentosa quando invade tecidos⁴. Em alguns casos apresenta-se em estado misto. Multiplica-se por brotamento, em algumas situações pode produzir tubos germinativos e então crescer como pseudo-hifa ou hifa verdadeira (**Figura 1A**). As hifas apresentam maior capacidade de penetração nos tecidos epiteliais de forma que são consideradas invasivas e patogênicas. A transição morfológica entre leveduras e as formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) é regulada por fatores externos associados às condições ambientais, tais como, componentes do soro humano, pH, elevação de temperatura corpórea, baixos níveis de oxigênio, altos níveis de CO₂, deficiência nutricional, entre outros⁵. Este polimorfismo bem como, a capacidade de organização em biofilmes, são

essenciais para colonização, infecção do hospedeiro e virulência de *C. albicans*

5

A formação do biofilme (**Figura 1B**) possui início na etapa de adesão na qual as células planctônicas em forma de levedura aderem às superfícies bióticas ou abióticas^{2,6,7}. A adesão em superfícies bióticas ocorre por meio de interações moleculares mediadas por ligações ligante-receptor^{2,6,8}. Em superfícies abióticas este processo é considerado complexo, ainda não completamente elucidado, pois ocorre através de interações físico-químicas não específicas entre o fungo e a superfície abiótica (cateter ou implantes médicos)⁶. Estas interações ocorrem aleatoriamente, através de força gravitacional, movimento browniano ou de forma ordenada, forças hidrodinâmicas, hidrofóbicas, eletroestáticas, força de Van der Waals e força de atração e repulsão entre estas interações⁶.

Após a adesão, há uma fase de proliferação na qual as células proliferam aumentando em número e formando microcolônias. Iniciam-se mecanismos de comunicação celular, levando à expressão de genes que são responsáveis pela transição de leveduras para hifas^{2,9}. Na fase de maturação ocorre a formação das hifas e produção de matriz polissacarídica extracelular, composta por proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos e lipídios. Leveduras, hifas e pseudohifas são envolvidas por esta matriz, que se comporta como uma proteção a agressões físico-químicas^{2,6,7}.

Por último, na fase de dispersão, células de levedura são liberadas do biofilme para os arredores, iniciando um novo ciclo de vida, seja colonizando outras superfícies que estabelecem um novo foco de infecções ou entrando na corrente sanguínea, levando a infecções sistêmicas^{6,7}.

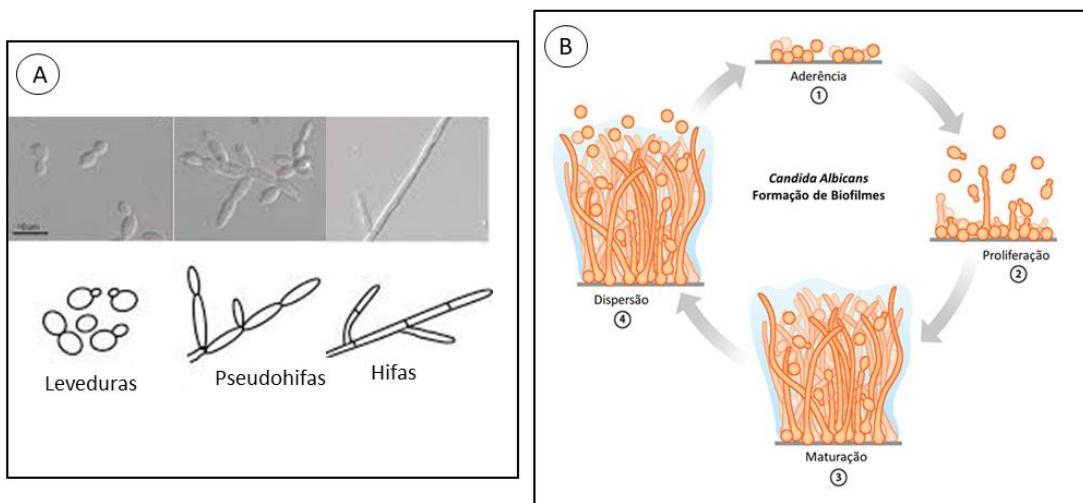


Figura 1: Apresentações morfológicas e formação do biofilme de *Candida albicans*. (A) Principais morfologias apresentadas (Traduzido de ¹⁰); (B) ciclo de vida do biofilme de *C. albicans* 1: Adesão de células em forma de levedura a uma superfície; 2: Proliferação celular, formando uma camada de células de ancoragem; 3: Maturação, incluindo crescimento de hifas concomitante com a produção de matriz extracelular; 4: Dispersão de células em forma de levedura para semear novos locais (Adaptado de ²).

Desta forma, os biofilmes exibem características fenotípicas específicas, como alta resistência a agressões químicas e físicas e alta resistência a diversos antifúngicos, além de possuir patogenicidade mais forte do que a forma de levedura ^{3,7,11,12}. *C. albicans* possui diversos mecanismos de virulência que contribuem a sua patogenicidade, incluindo a capacidade de resistência a medicamentos que podem tornar as infecções particularmente difíceis de tratar². A resistência antifúngica é baseada em diferentes mecanismos como, a redução do acúmulo intracelular do fármaco, a diminuição da afinidade do fungo pelo fármaco, a redução do efeito da droga, a penetração de drogas restrita através da matriz de biofilme, bombas de efluxo, a mutações na codificação genética e a modificação da atividade enzimática, o mecanismo mudara dependendo do modo de ação do fármaco ^{4,6}.

Candidíase é um termo que se refere às infecções causadas por fungos do gênero *Candida*. Entre elas pode-se citar doenças cutâneas, infecções

superficiais das mucosas, derme ou órgãos profundos, bem como infecções sistêmicas^{3,13}. Dentre as manifestações clínicas da candidíase pode-se citar candidíase oral, vulvovaginal, candidíase intertriginosa, onicomicose, balanopostite, entre outros³. As manifestações invasivas ou sistêmicas, podem localizar-se em um órgão causando infecções profundas como, abscesso intra-abdominal, peritonite (inflamação do peritônio, o tecido que cobre a parede interior do abdômen e órgãos abdominais) ou osteomielite (infecção dos ossos) ou infecções disseminada na corrente sanguínea (candidemia), sendo as principais causas de morbidade e mortalidade^{3,13}.

Infecções por *Candida* são especialmente graves em indivíduos imunocomprometidos como, pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou em terapia de imunossupressão⁶, e em pessoas saudáveis com dispositivos médicos implantados⁹, como cateteres venosos centrais e urinários^{9,13}, marcapassos⁴, válvulas cardíacas mecânicas¹⁴, próteses articulares¹⁴, lentes de contato e prótese dentaria total^{1,4,14}.

Entre as drogas antifúngicas que são mais utilizadas como agentes terapêuticos para o tratamento de infecções fúngicas estão os polienos (anforericina B e nistatina), azólicos (fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) e equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina). Estes medicamentos geralmente apresentam efeitos colaterais significativos em humanos, causando toxicidade ao fígado, rins e sistema nervoso central². Neste sentido se faz necessário encontrar estratégias terapêuticas alternativas e eficazes, contexto no qual a terapia fotodinâmica apresenta-se como uma proposta interessante.

1.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

O primeiro relato da ação conjunta de um corante e a luz se deu no início do século XX, quando Oscar Raab, um estudante orientado pelo Professor Herman Von Tappeiner, observou o efeito do corante de acridina em culturas de paramécio^{15,16}. Em 1908, a terapia fotodinâmica passou por um grande avanço, surgindo os primeiros relatos sobre o uso de porfirinas como substâncias fotossensibilizadoras^{15,16}.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é um método de tratamento que tem se mostrado promissor em diferentes áreas da saúde, incluindo odontologia e medicina, por seu efeito antitumoral e antimicrobiano. Baseia-se na utilização de moléculas fotossensíveis, chamadas de fotossensibilizadores (FSs), que são então ativadas por luz de comprimento de onda e intensidade adequados. A ativação dos FSs pela luz leva à formação de espécies reativas de oxigênio que oxidam biomoléculas importantes para a estrutura e função de organelas, causando danos e morte celular. Portanto, para o efeito da aPDT são necessários 3 fatores: fotossensibilizador, luz e oxigênio^{17,18}.

Os mecanismos da aPDT partem do princípio de que a luz é absorvida pelo FS em seu estado singlete fundamental (S_0), de forma que o FS atinge o primeiro estado excitado singlete (S_1), de tempo de vida curta ($\sim 10^{-6}$ s). A partir do S_1 o FS pode perder a energia por emissão de luz por fluorescência, retornando para o estado fundamental ou por cruzamento intersistemas, o FS pode passar a um estado excitado tripleno (T_1) de tempo de vida relativamente mais longo ($\sim 10^{-2}$ s). Por sua vez o FS em T_1 pode emitir luz por fosforescência e retornar para o estado fundamental ou interagir com outras moléculas

participando de dois tipos de reações, conforme mostrado no diagrama de Jablonski (**Figura 2**)¹⁹⁻²².

Na reação tipo 1, o FS em T₁ pode reagir diretamente com biomoléculas e transferir um elétron, formando um ânion radical ou cátion. Esses radicais podem ainda reagir com oxigênio podendo produzir produtos oxigenados como íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, gerando uma cascata de espécies reativas de oxigênio. Alternativamente também pode ocorrer reação tipo 2 na qual o FS em T₁ pode transferir sua energia diretamente para oxigênio fundamental, para formar oxigênio excitado singlet (¹O₂)¹⁹⁻²¹. As reações tipo 1 e tipo 2 podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre esses processos depende do tipo de FS utilizado, concentrações de FS, oxigênio e substratos, o meio no qual o FS está presente, entre outros¹⁹.

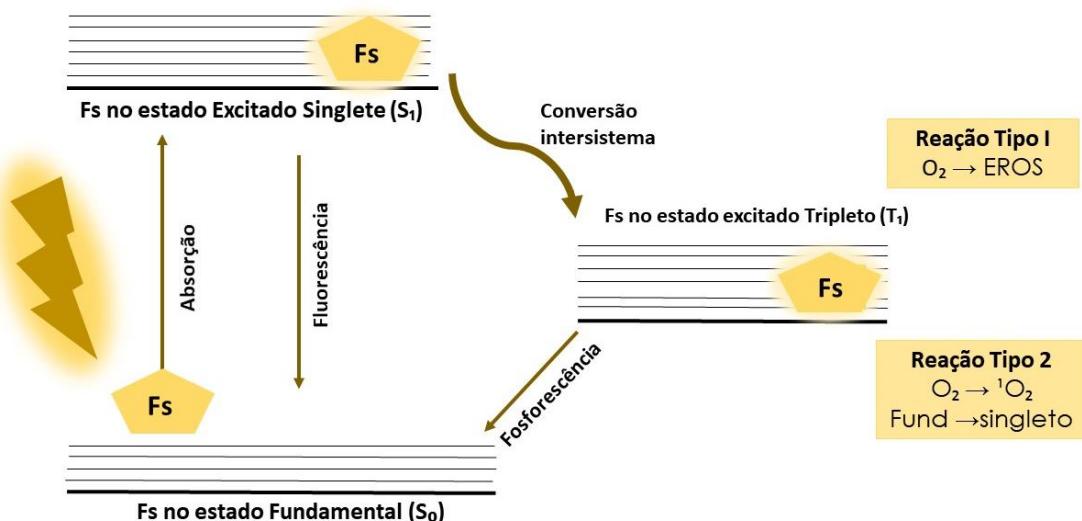


Figura 2: Diagrama de Jablonski. A absorção de um fóton de luz promove a excitação do FS do estado fundamental para o estado excitado singlete. Neste estado, o FS pode regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou passar ao estado excitado triplo onde pode interagir com o oxigénio molecular de duas formas distintas: transferência de elétrons (reação tipo I) levando à formação de radicais, e transferência de energia (reação do tipo II) levando à formação de oxigênio singlet.

Como resultado, a aPDT pode induzir diversos eventos nas vias de sinalização celular e molecular¹⁹. O diferencial no uso da aPDT é a variedade

de alvos biológicos, por sua ação se basear na geração de espécies oxidativas, que irão atuar em biomoléculas essenciais à estrutura e funções nos micro-organismos, tais como lipídeos, proteínas e DNA²³. Desta forma, a aPDT pode ser considerada uma terapia antimicrobiana de amplo espectro, atuando em bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos e vírus²⁴⁻²⁹. Além disso, devido à ação baseada em espécies reativas de oxigênio a aPDT tem sua ação independente da resistência microbiana³⁰⁻³³.

1.2.1 LEDs como fontes de luz na aPDT

As primeiras fontes de luz utilizadas na aPDT foram as lâmpadas convencionais, não coerentes, policromáticas e com forte componente térmico, o que resultava em aumento de temperatura da área irradiada.

O desenvolvimento de lasers possibilitou o uso de uma fonte de luz de baixa intensidade, capaz de estimular a reação fotodinâmica sem os efeitos térmicos indesejados¹⁶. Recentemente, foram desenvolvidos dispositivos que possibilitavam a combinação em painéis para promover a iluminação de uma superfície ampla e homogênea, os diodos emissores de luz (LEDs, do inglês, “*light emitting diodes*”)³⁴.

Torres-Hurtado e colaboradores³⁵ realizaram aPDT com LED vermelho associado ao azul de metíleno e verificaram aumento no efeito antimicrobiano com o aumento da exposição radiante, em uma irradiância constante. Outros autores também realizaram o uso dos LEDs em aPDT seja em exposição radiante fixa ou comparando os efeitos de diferentes exposições radiantes, com a facilidade de irradiar vários poços de uma placa simultaneamente.³⁶⁻³⁸

As principais vantagens do uso de LEDs estão relacionadas ao baixo custo e aplicação em várias amostras simultaneamente, mantendo características similares aos lasers como, boa eficiência, pouco calor depositado no meio de ganho, potência media, boa qualidade de feixe, emissão de luz em faixas estreitas (de 10 a 50 nm) de forma que tem aumentado o número de pesquisas, básicas ou clínicas, em aPDT^{16,30,39}.

Diante dos dados apresentados, neste trabalho iremos utilizar como fonte de luz o LED pela sua versatilidade, permitindo a irradiação simultânea de vários poços para avaliação de diferentes condições experimentais.

1.2.2 Fotossensibilizadores (FS)

Os FSs são substâncias capazes de absorver luz de um comprimento de onda específico desencadeando a formação de espécies reativas de oxigênio⁴⁰. Um FS ideal apresenta características como alta pureza química, síntese simples, estabilidade, alta reatividade fotoquímica, baixa toxicidade na ausência de luz, alta seletividade às células alvo, baixa agregação em soluções aquosas e elevada absorção de luz na região do espectro visível, chamada de janela terapêutica (400-700 nm)⁴⁰. Existem vários tipos de substâncias que vem sendo desenvolvidas e testadas para aPDT, como por exemplo porfirinas, clorinas, fenotiazínicos entre outros^{16,40}.

Fotossensibilizantes fenotiazínicos são compostos que apresentam estrutura molecular composta por um esqueleto tricíclico com grupos laterais auxocrônicos, catiônicos, cujo rendimento quântico de produção de oxigênio singlete fica em torno de $\Phi \approx 0,5$ em meio aquoso⁴⁰. Moléculas como o azul de metileno (AM), azul de toluidina, azure A (AA), azure B (AB), dimetil azul de

metileno (DMAM), tionina pertencem a esta classe, sendo o AM a mais estudada para aPDT antimicrobiana entre elas ⁴¹⁻⁴⁵.

O AM é bastante utilizado na área médica como medicamento antimalárico, tratamento da metemoglobinemia, corante médico entre outras aplicações que não envolvem o uso da luz ⁴⁶. Por se tratar de um FS de baixo custo, tornou-se um agente de fotossensibilizante extremamente difundido no Brasil (Figura 3) ¹⁶.

O AA é um composto orgânico, um corante com a fórmula química $C_{14}H_{14}ClN_3S$, de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), é oficialmente denominado N'N'-dimetilfenotiazina-5-il-3,7- cloreto de diamina (Figura 3). É um popular agente de coloração em histologia, e tem sido estudado como base para desenvolvimento de agentes de imagem para doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e Parkinson; biosensor eletroquímico, entre outros ^{47,48}. Em aPDT, em células eucarióticas interrompe processos relacionados à bioenergética mitocondrial e perturba membranas celulares, mesmo em células que não evoluem para a morte de modo que sugere-se que seu uso seja mais seguro de forma tópica ⁴⁹.

Similarmente, o AB é um composto orgânico com uma fórmula molecular de $C_{15}H_{16}ClN_3S$, são moléculas catiônicas com uma estrutura química básica formada por três anéis aromáticos com nitrogênio e enxofre como heteroátomos, como o azure A ⁵⁰. É um corante de comportamento semelhante aos corantes básicos para mudança de cor, usados em marcações histológicas (Figura 3). A cor do corante varia de verde (para cromossomos) a azul (para ribossomos nucleares e citoplasmáticos) e vermelho (para depósitos contendo

mucopolissacarídeos) devido à propriedade chamada metacromasia^{48,49,51}. Em células eucarióticas mostrou efeito fotodinâmico considerável, atuando em mitocôndrias, afetando a bioenergética e também na redução de glutatona porém em modelo animal foi observada elevada hepatotoxicidade⁵⁰. Estes achados sugerem que o uso tópico do AB como agente FS pode ser mais indicado do que seu uso sistêmico.

O dimetil azul de metileno (DMAM), é um derivado lipofílico do AM, com maior capacidade de interação com membranas quando comparado aos demais FSs apresentados anteriormente^{52,53}.

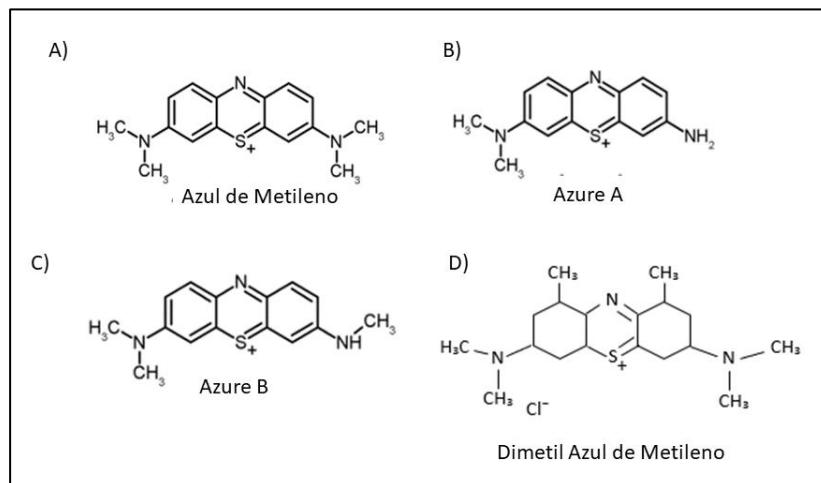


Figura 3: Estrutura química dos fotossensibilizadores. A) fenotiazínicos azul de metileno; B) fenotiazínicos azure A; C) fenotiazínicos azure B; D) fenotiazínicos dimetil azul de metileno.

Em termos da ação antimicrobiana em aPDT dos fenotiazínicos, Collina e colaboradores⁵³ mostraram em culturas planctônicas de *Candida albicans* que para uma mesma dosimetria de luz (640nm, 2,6 mW/cm², 30 minutos de exposição atingindo 4,7 J/cm²), AA a 10 mg/L foi capaz de reduzir 1log UFC/mL em relação ao grupo controle; AB também a 10 mg/L não causou alteração nas UFC/mL; enquanto DMAM a 1 mg/L era capaz de inativar totalmente (redução

de 6 log UFC/mL). Já o AM, avaliado em estudo anterior, não causou alteração nas UFC/mL quando comparado ao grupo controle, mas mesmas condições de irradiação mencionadas acima, porém a 20 mg/L⁵⁰. Estes dados mostram que há uma diferença na eficácia dos FSs fenotiazínicos em cultura planctônica, porém ainda não existem relatos comparando a mesma dosimetria em modelos de biofilme, o que motivou a realização do presente estudo.

Sabino e colaboradores³⁸ avaliaram o efeito da aPDT (LED a 660 nm) associada ao AM veiculado em PBS a 100µM em suspensões de *C. albicans* e verificaram que para atingir a inativação (redução de 3 Log) foram necessários 25 J/cm², sendo que *C.albicans* apresentou maior resistência à aPDT que outras cepas de fungos ou bactérias. Freire e colaboradores⁵⁴ relataram que a uma concentração de 300 µmol/L de AM diluído em água e dosimetria de 13,8 mW/cm², 285 segundos de irradiação e 3,93 J/cm² houve redução estatisticamente significante nas UFC/mL porém menor que 1 Log. Esta redução é muito pequena quando se considera o crescimento dos micro-organismos, visto que desta forma é possível que a proliferação dele recupere essa redução em curto tempo. Neste sentido, parâmetros como a concentração utilizada e o meio no qual o AM foi veiculado podem ter influenciado na baixa eficácia observada.

Por outro lado, Prates e colaboradores⁵⁵, investigaram a suscetibilidade de *C. albicans* e *C. crucei* à aPDT com AM variando a irradiação e tempo de irradiação. Nas duas irradiações utilizadas foi observada dependência da morte celular em relação ao tempo de irradiação, de modo que maior o tempo de irradiação utilizado maior foi a morte celular, porém essa resposta de morte foi mais acentuada na maior irradiação do que a menor. A irradiação de 100

mW/cm² apresentou efeito fungicida moderado visto que a inativação fúngica (redução de 3 Logs) necessitava de tempos de irradiação de 9 minutos ou mais. Por outro lado, a irradiância de 300 mW/cm² foi mais efetiva, levando à inativação fúngica em menor tempo de irradiação (aproximadamente 3 minutos). Este trabalho demonstrou que a exposição radiante é um parâmetro importante, porém a escolha da irradiância é essencial para que a aPDT possa ter elevada eficácia.

Ainda a respeito de dosimetria, Leonel e colaboradores⁵⁶ observaram que quanto maior a exposição radiante maior o efeito da aPDT. Em cultura planctônica de *C. albicans* tratada com aPDT utilizando AM 0,02 mg/L foram relatados 20, 48 e 53% de inibição no crescimento usando exposições radiantes de 10, 20 e 30 J/cm², respectivamente, porém mesmo diante disto esta redução ainda é considerada pequena, de modo que é possível que a utilização de exposições radiantes maiores levariam à maiores efeitos. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme após o tratamento com aPDT (nos mesmos parâmetros mencionados anteriormente) em cultura planctônica, de modo que foi observada menor habilidade de formação de biofilme de 58, 70 e 74% usando as exposições radiantes de 10, 20 e 30 J/cm², respectivamente. Por fim, em biofilme com 24 horas de crescimento (fase de maturação) foi observado 60% de inibição a 0,02 mg/L e 40 J/cm²⁵⁶.

Neste sentido, a dosimetria escolhida para o referido trabalho partiu de estudo anterior do grupo.⁵⁷ A concentração dos FSs utilizada foi a mesma avaliada para biofilmes (50 mg/L), porém, os parâmetros de luz foram alterados, visto que no trabalho usado como referência foram sugeridas algumas alterações. A irradiância foi aumentada para 37,3 mW/cm² máxima possível no

equipamento de LED do grupo, sendo que trabalhos utilizando outros dispositivos relatam uso de irradiações ainda maiores ($90\text{-}100\text{mW/cm}^2$)^{55,58,59}, mostrando que uma elevada irradiação é usual e leva a inativação ou sensibilização do fungo. A exposição radiante também foi aumentada de $4,7\text{ J/cm}^2$ no trabalho anterior para 60J/cm^2 neste atual trabalho.

Outros estudos prévios que inspiraram o trabalho atual incluem aquele realizado por Leonel e colaboradores⁵⁶, que mostraram que em uma mesma condição experimental o maior impacto da aPDT se deu na formação de biofilme, seguido da inibição do biofilme em crescimento e por fim, a inibição do biofilme já em dispersão, sendo que em nenhuma das condições relatadas houve inativação de *C. albicans* (redução de 99,9%).

Tendência similar foi observada por Bapat e colaboradores², que observaram aproximadamente 20% de redução na aderência das células planctônicas, 40% de inibição da formação do biofilme e não houve efeito em termos do biofilme maduro quando realizada aPDT com uso do LED vermelho associado ao novo azul de metileno. Desta forma, é importante investigar o uso da aPDT nas diferentes etapas de formação do biofilme para que seja possível desenvolver protocolos que sejam eficazes nas diferentes condições que poderiam se dar clinicamente.

Considerando o caráter mais resistente de biofilmes, Melendez-Celis e colaboradores⁶⁰ observaram que a realização de múltiplas sessões aumentou a inibição de *C. albicans*, isso é, os resultados são melhores utilizando 2 ou 3 sessões de menor exposição radiante ($5,6\text{ J/cm}^2$) do que uma única sessão com o dobro ($11,3\text{ J/cm}^2$) ou triplo (17 J/cm^2) da exposição radiante utilizada nas sessões fracionadas. Resultados similares foram observados por Torres-

Hurtado e colaboradores ³⁵, que aplicações repetidas de luz ao invés de uma aplicação única, melhora a eficácia do efeito inibitório no crescimento dos micro-organismos, neste caso 3 aplicações de 20J/cm² e AM a 10µM se mostra como um tratamento melhor para *C.albicans* ³⁵.

Por fim, Lapena e colaboradores ⁶¹, ao avaliarem os efeitos da aPDT, com AM associado a quitosana em diferentes fases de crescimento do biofilme e em células resistentes ao fluconazol observaram efeitos antimicrobianos potencializados havendo redução de 2 logaritmos de UFC/mL em relação ao grupo tratado sem quitosana. Esse trabalho mostra que a associação do FS com certas substâncias podem potencializar a PDT como no caso da quitosana ⁶¹.

Collina e colaboradores também mostraram que os FSs fenotiazínicos são mais eficazes em causar a morte de *C. albicans* quando aplicados na presença de SDS do que em água, soro fisiológico ou tampão fosfato salino^{53,57}. Isso acontece devido a uma propriedade dos fenotiazínicos chamada metacromasia. Dependendo do meio no qual estão veiculados estes FSs agregam, alterando suas características de absorção da luz ^{62,63}. O espectro de absorção pode ser utilizado para identificação das formas agregada e não agregada do AM, por exemplo, uma vez que o monômero apresenta máximo de absorção em 664nm e o dímero 590nm (Figura 4) ⁶⁴.

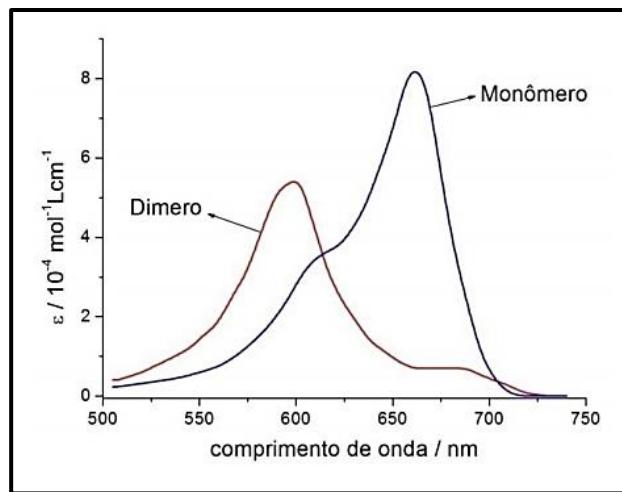


Figura 4: Espectros de absorção do monômero (azul) e dímero (vermelho) do azul de metileno⁶⁴.

Tabela 1: Dados bibliográficos sobre uso aPDT em Candida com fenotiazínicos.

AUTOR	Microrganismo	Modelo	FS Concentração	Fonte de luz	Meio	Resultado observado
Bapat e colaboradores, 2021².	<i>C.albicans</i> (SN250)	Planctônico Biofilme	Novo azul de metileno 400 µM	LED Vermelho $\lambda = 620 - 630$ nm $I =$ não apresentado $t_{irr} = 90$ min and 24 h $ER = 176$ J/cm ²	Meio Spider	20% de inibição da aderência e 40% de inibição do crescimento do biofilme. Sem efeito em biofilme maduro.
Collina e colaboradores, 2018⁵⁷.	<i>C.Albicans</i> (ATCC 10231)	Planctônico Biofilme	AM 20 e 50 mg/L	LED cluster $\lambda = 640 \pm 10$ nm, $I = 2,6$ mW/cm ² $t_{irr} = 30$ min $ER = 4,7$ J/cm ²	Solução fisiológica, água, PBS, SDS 0,25% e Ureia 1 mol/L.	Planctônico Somente na presença SDS houve inativação fúngica a 20 mg/L Biofilme Redução de 1 Log na presença de SDS com AM a 50 mg/L
Collina e colaboradores, 2020⁵³.	<i>C.Albicans</i> (ATCC 10231)	Planctônico	AM, AA, AB, DMAM – 0 a 100 mg/L	LED cluster $\lambda = 640 \pm 10$ nm, $I = 2,6$ mW/cm ² $t_{irr} = 30$ min $ER = 4,7$ J/cm ²	Solução fisiológica, água, PBS, SDS e Ureia	AA atingiu 2,0 Redução de Log10 a 100 mg/L, AB atingiu uma redução de 1,5 Log10, enquanto DMMB inativou os fungos para 1,0 mg/L.
Freire e colaboradores, 2015⁵⁴.	<i>C.albicans</i> (ATCC 18804) E isolados clínicos	Biofilme	AM 300µM	Laser AlGaAs $\lambda = 660$ nm $I = 13,78$ mW/cm ² $t_{irr} = 285$ s $ER = 3,93$ J/cm ²	NaCl	aPDT (azul de metileno+irradiação a laser de baixa intensidade) mostrou uma leve redução UFC Log 2,32.

Lapena e colaboradores	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	Planctônico Biofilmes células persistentes	AM (300 e 600 μM)	LED $\lambda = 660 \text{ nm}$ $I = 42 \text{ mW/cm}^2$ $t_{irr} = 714 \text{ s}$ $ER = 30 \text{ J/cm}^2$	solução fisiológica	aPDT com AM e quitosana diminuiu 2 logaritmos de UFC/mL em relação ao aPDT com AM.
Leonel e colaboradores, 2019⁵⁶.	<i>C. albicans</i> (ATCC 1023)	Planctônico Biofilmes	AM (0,005, 0,01 e 0,02 mg/L)	Laser vermelho $\lambda = 660 \text{ nm}$, $I = 263 \text{ mW/cm}^2$ $t_{irr} = 38; 76; 114 \text{ e } 152$ $ER = 10 \text{ J/cm}^2, 20 \text{ J/cm}^2,$ $30 \text{ J/cm}^2 \text{ e } 40 \text{ J/cm}^2$	Água	53% de inibição no crescimento da cultura planctônica e 74% de redução na capacidade de formação do biofilme a 0,02 mg/L e 30 J/cm ² ; 60% de inibição em biofilme maduro a 0,02 mg/L e 40 J/cm ² .
Mendelez-Celis e colaboradores, 2021⁶⁰.	<i>C. albicans</i> Cepa laboratorial e de paciente	Planctônico	AM 200 μM	LED vermelho $\lambda = 650 \text{ nm}$, $I = 9,44 \text{ mW/cm}^2$ $t_{irr} = 9,8; 19,6; 29; 60 \text{ min}$; $ER = 5,6; 11,3; 17 \text{ J/cm}^2$	PBS	Inativação obtida com 1 aplicação de 34J/cm ² ou em 3 aplicações de 11,3 J/cm ² na cepa laboratorial. Inativação (redução de 100%) em 3 aplicações de 11,3 J/cm ² na cepa de paciente e redução de apenas 75% a 34 J/cm ² .
Prates e colaboradores, 2009⁵⁵.	<i>C. Albicans</i> (ATCC 90028) <i>C. Krusei</i> (ATCC 6258)	Planctônico	AM 100 μM	Laser de Diodo GaAlAs $\lambda = 660 \text{ nm}$, $I = 100 \text{ e } 300 \text{ mW/cm}^2$ $t_{irr} = 3, 6, \text{ e } 9 \text{ min}$ $ER = 18, 36, 54, 108 \text{ e } 162 \text{ J/cm}^2$	Água	<i>C. albicans</i> Inativação em 6 e 9 min a 300 mW/cm ² Redução de 3 Log 9 min 100 mW/cm ²
Sabino e colaboradores, 2020³⁸.	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028) Bacterias	Planctônico	AM 100 μM	LED vermelho $\lambda = 660 \text{ nm}$, $I = 100 \text{ mW/cm}^2$ $t_{irr} = 10 \text{ min}$ $ER = 0-30 \text{ J/cm}^2$	PBS	<i>C. albicans</i> foi inativada (3 logs) a 25 J/cm ²
Torres-Hurtado e colaboradores, 2019³⁵.	<i>C. albicans</i>	Planctônico	AM 5 a 60 μM	LED vermelho $\lambda = 600 - 650 \text{ nm}$, $I = 85,7 \text{ mW/cm}^2$ $ER = 5, 10, 20, 30, 45 \text{ e } 60 \text{ J/cm}^2$	PBS	Inibição total do crescimento a 20 μM e 60 J/cm ² . Em 3 aplicações repetidas, 10 μM e 20 J/cm ² são suficientes para atingir a inibição do crescimento em 99,9%.

O termo "agregado" é derivado do termo latim "aggregare", que se refere a aglomerados. É um grupo de partículas ou moléculas que formam aglomerados sem ligações químicas. A formação de agregados é um processo comum para compostos como sistemas conjugados (π), e ocorre apenas quando a energia coesiva entre as moléculas constituintes do agregado é maior que a energia da interação entre seus monômeros e o ambiente, ou seja, termodinamicamente, o agregado deve ser estável ^{65,66}. Estes agregados são produzidos devido à fatores como interações eletrostáticas, formação de ligação de hidrogênio, formação de complexos tipo π - π , interações hidrofóbicas, interações iônicas, e variam em função de pH, presença membrana celulares, microambiente proteico e biopolímeros (DNA, proteínas) entre outros ^{65,67}.

A formação de agregados minimiza eficácia do processo fotodinâmico, pois aumenta o rendimento quântico de processos não radiativos, resultando em um menor tempo de vida do estado tripleto e dificultando a transferência de energia do FS para $^1\text{O}_2$ ^{68,69}. Sabe-se que o AM, tem ação fotoquímica modulada por seu estado de agregação. Quando é um monômero, o AM eletronicamente excitado leva à produção de oxigênio singlete; enquanto a excitação dos dímeros leva à produção de radicais livres ⁶². Por este motivo, neste trabalho foi utilizado um grupo utilizando SDS como veículo, pelo seu efeito em reduzir agregação, além de mostrar melhores resultados na sensibilização e inativação da *C.albicans* ⁵⁷.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a eficácia da aPDT com fotossensibilizadores fenotiazínicos realizada nas diferentes etapas de formação do biofilme

2.2 Objetivos Específicos

Comparar o efeito da aPDT antimicrobiana em *C. albicans* utilizando fenotiazínicos (AM, AA, AB, DMAM) veiculados em água e associado ao dodecilsulfato de Sódio (SDS):

- Antes da fase de adesão para formação de biofilmes.
- Em biofilmes na fase de maturação (24h), comparando a resposta de uma e duas sessões de aPDT.
- Em biofilmes em fase de dispersão (48h), comparando a resposta de uma e duas sessões de aPDT.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Foram usados Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Curitiba, Brasil), Meio caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi, Curitiba, Brasil), vórtice (Jand Química, São Paulo, Brasil) e Soro Fetal bovino (Vitrocell São Paulo, Brasil).

Os FSs azul de metileno, azure A, azure B e dimetil azul metileno foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos).

O dispositivo LED utilizado neste trabalho foi Ledbox (Biolambda, São Paulo, Brasil), conforme parâmetros apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros dosimétricos LED para aplicação única de aPDT.

Parâmetros	Fonte/LED
Comprimento de onda (nm)	660
Modo de Operação	Continuo
Potência Radiante média (W)	6,08
Área irradiada (cm²)	163
Irradiância (mW/cm²)	37,3
Duração da exposição (s/min)	1620/27
Exposição radiante (J/cm²)	60,4
Energia Radiante por placa (kJ)	9,84

3.2. Desenho experimental

Os grupos experimentais foram divididos em grupos com os FSs veiculados em água e grupos com os FSs veiculados em solução aquosa contendo SDS 0,25%, em ambos os casos foram subdivididos em CT (apenas o veículo), AM, AA, AB e DMAM (**Figura 5**).

Sem SDS	CT	AM	AA	AB	DMAM
SDS	CT SDS	AM SDS	AA SDS	AB SDS	DMAM SDS

Figura 5: Grupos experimentais do estudo.

A eficácia da aPDT, em função dos grupos de tratamento selecionados, foi avaliada em diferentes fases de crescimento da *C. albicans*, conforme apresentado na (Figura 6).

- 1) *C. albicans* em fase de suspensão para avaliar a eficácia da aPDT em reduzir a capacidade das leveduras de aderência e formação de biofilmes;
- 2) *C. albicans* em biofilmes em fase de maturação com crescimento por 24 horas para avaliar a eficácia da aPDT em tratar biofilmes já formados (que em uma situação clínica podem estar em superfícies bióticas ou abióticas como cateteres);
- 3) *C. albicans* em biofilmes em fase de dispersão com crescimento no período de 48 horas, para avaliar a capacidade da aPDT em reduzir a dispersão de leveduras e disseminação a infecção.

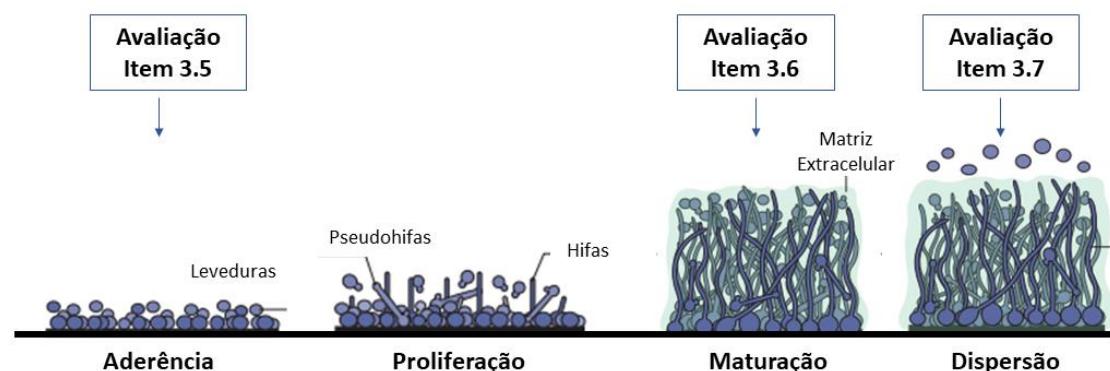


Figura 6: Desenho do estudo. Dentre as fases do crescimento do biofilme, foi avaliado o efeito da aPDT em reduzir a aderência das leveduras, em romper o biofilme maduro e em minimizar o efeito de dispersão do biofilme.

3.3 Preparo das soluções

Para realização dos experimentos foram preparadas soluções estoque dos FSs AM, AA, AB e DMAM em água a 1 mg/mL. Para isso, foram pesados 10,0 mg (AM, AA, AB, DMAM) que foram diluídos, em capela de fluxo laminar, em 10,0 mL de água milli-Q estéril. Estas soluções foram preparadas e mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por no máximo 3 meses antes do uso.

Para a solução estoque de SDS em água na concentração de 5% foram pesados 500 mg de SDS e dissolvidos em 10,0 mL de água milli-Q estéril, em capela de fluxo laminar. Para os experimentos essa solução era diluída 10 vezes ou 20 vezes para atingir as concentrações de 0,50% ou 0,25%.

Para os experimentos em suspensão, as soluções preparadas precisavam ter concentrações que eram o dobro daquelas que seriam testadas (tanto para o FS quanto para o SDS), visto que a mistura 1:1 com o inóculo de levedura resultava em concentração final metade da inicial. Desta forma, as soluções dos FSs em água (100 mg/L) foram preparadas diluindo 1000 µL da solução estoque do FS em 10 mL de água milli-Q estéril, enquanto as soluções dos FSs em SDS foram preparadas por meio da diluição de 1000 µL da solução estoque de FS foram em 10 mL de SDS na concentração de 0,50%⁵⁷.

Para os ensaios em biofilme, a partir das soluções estoque descritas anteriormente, foram feitas diluições para obtenção das soluções de trabalho que eram aplicadas diretamente nos poços das placas contendo os biofilmes aderidos ao fundo. As soluções dos FSs em água (50 mg/L) foram preparadas diluindo 500 µL da solução estoque do FS em 10 mL de água milli-Q estéril, enquanto as soluções dos FSs em SDS foram preparadas por meio da diluição

de 500 µL da solução estoque de FS foram em 10 mL de SDS na concentração de 0,25%⁵⁷.

As concentrações aqui apresentadas foram determinadas seguindo trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, sendo necessário readaptar suas concentrações para o uso em suspensão, visto que apesar de serem mesmo número ATCC, a cepa utilizada neste trabalho deve origem diferente das dos trabalhos anteriores do grupo e a resposta ao tratamento mostrou-se diferente 53,57.

3.4. Preparação de suspensão

A levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) foi cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose a 37 °C durante 24 horas. Depois da preparação de uma suspensão em água, foi realizada contagem em Câmara Neubauer e diluição para 5×10^7 cels/mL⁵⁷.

3.5 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM antes da fase de adesão de biofilmes (suspensão)

Em placas de 48 poços, 0,20 mL da suspensão de *C. albicans* (5.0×10^7 células/mL) e 0,20 mL das soluções de tratamento (100 mg/L FSs e 0,50% SDS) foram mantidos por 5 minutos no escuro⁵³. Em seguida, uma placa foi mantida no escuro por 27 minutos enquanto outra foi irradiada com um dispositivo LED, segundo parâmetros dosimétricos apresentados no item 3.1.

Após a irradiação, cada amostra foi colocada em microtubos e foram centrifugadas a 0,2 xg por 5 minutos. O sobrenadante contendo a solução de tratamento foi descartado, lavado com PBS, sendo que, por fim as amostras

foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Um volume de 0,10 mL destas suspensões, foram transferidas para poços individuais em placas de 48 poços, juntamente com 0,30 mL do Meio Caldo Sabouraud Dextrose (**Figura 7**). As placas foram incubadas a 37 °C, 50 RPM, para formação dos biofilmes. Após 24 horas foi realizado o ensaio de contagem das unidades formadoras de colônias (item 3.5.1).

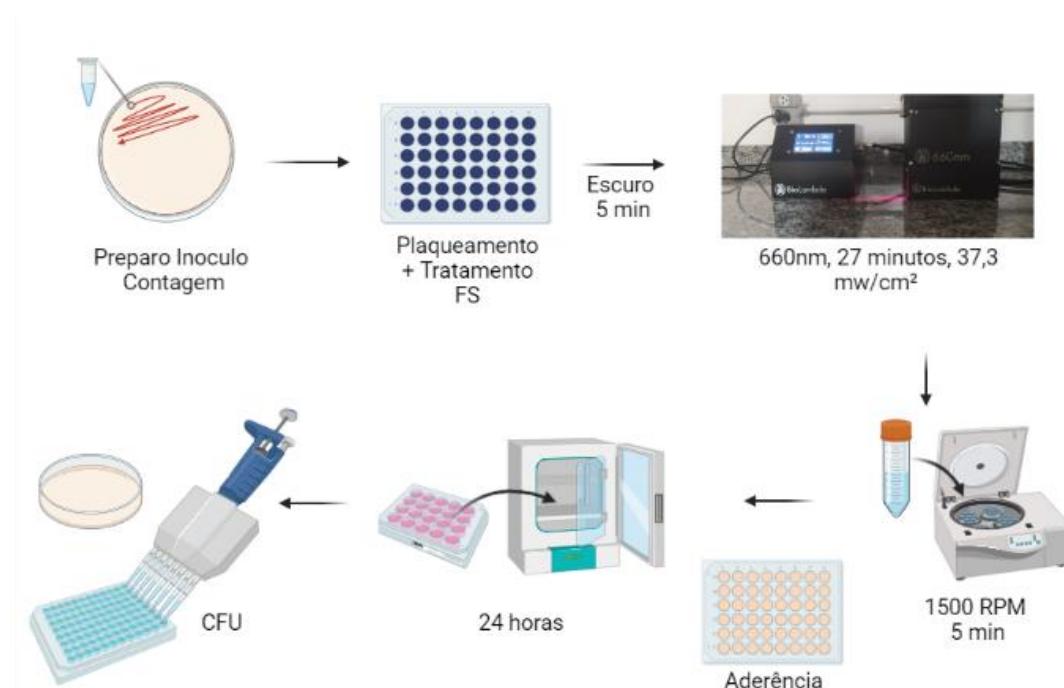


Figura 7: Metodologia do ensaio em suspensão.

3.5.1 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

Após remoção do meio de cultivo e lavagem com PBS, são adicionados 0,20 mL de PBS e os biofilmes foram rompidos por múltiplas pipetagens, seguido de agitação em um vórtice por 1 minuto. Uma alíquota de 20,0 μ L da suspensão foi retirada de cada amostra, diluições seriadas foram realizadas em 180 μ L de água (10^{-1} a 10^{-5}), e as amostras foram espalhadas em estrias no topo de placas de petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (**Figura 8**). As placas de Petri foram

mantidas por 24 h a 37 °C, e o unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram contadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes ^{57,70}.

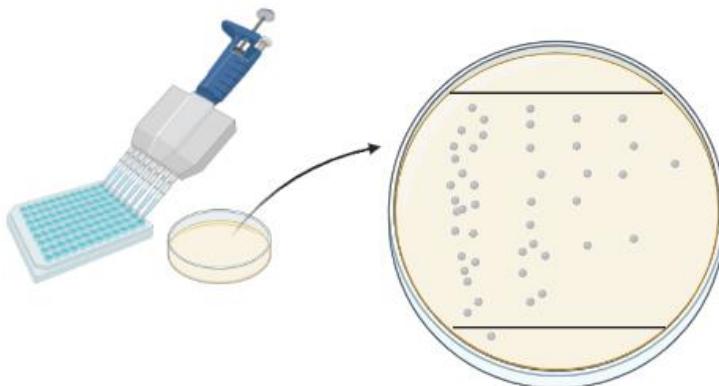


Figura 8: Ensaio unidades formadora de colônias.

3.6 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme na fase de maturação (24 horas)

Uma placa de 48 poços foi tratada com Soro Fetal bovino por 24 horas. O Soro Fetal Bovino foi removido e 0,10 mL da suspensão de *C. albicans* (5.0×10^7 células/mL, preparada conforme item 3.4) foram adicionados aos poços, juntamente com 0,30 mL do Meio Caldo Sabouraud Dextrose. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C, 50 RPM, para a formação dos biofilmes. O sobrenadante mais tarde foi descartado e os biofilmes, aderidos, foram lavados com o tampão (PBS). Os biofilmes foram então expostos às soluções FS a 50 mg/L (Água ou fórmula contendo SDS a 0,25%) sendo mantidos por 5 minutos no escuro. A irradiação foi realizada conforme parâmetros dosimétricos item 3.1. Após os tratamentos, as soluções foram removidas, os biofilmes foram lavados

com PBS e rompidos por múltiplas pipetagens para realização do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias (item 3.5.1) (Figura 9).

3.7 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme fase de dispersão (48h)

Uma placa de 48 poços foi tratada com Soro Fetal bovino por 24 horas. O Soro Fetal Bovino foi removido e 0,10 mL da suspensão de *C. albicans* (5.0×10^7 células/mL, preparada conforme item 3.4) foram adicionados aos poços, juntamente com 0,30 mL do meio Caldo Sabouraud Dextrose. A placa foi incubada por 48 horas a 37 °C, 50 RPM, para a formação do biofilme. Após este período, o sobrenadante foi descartado e os biofilmes aderidos foram lavados com o tampão (PBS). Os biofilmes foram então expostos às soluções FS a 50 mg/L (Água ou fórmula contendo SDS a 0,25%) sendo mantidos por 5 minutos no escuro. A irradiação foi realizada conforme parâmetros dosimétricos item 3.1. Após os tratamentos, as soluções foram removidas, os biofilmes foram lavados com PBS e rompidos por múltiplas pipetagens para realização do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias (item 3.5.1) (Figura 9).

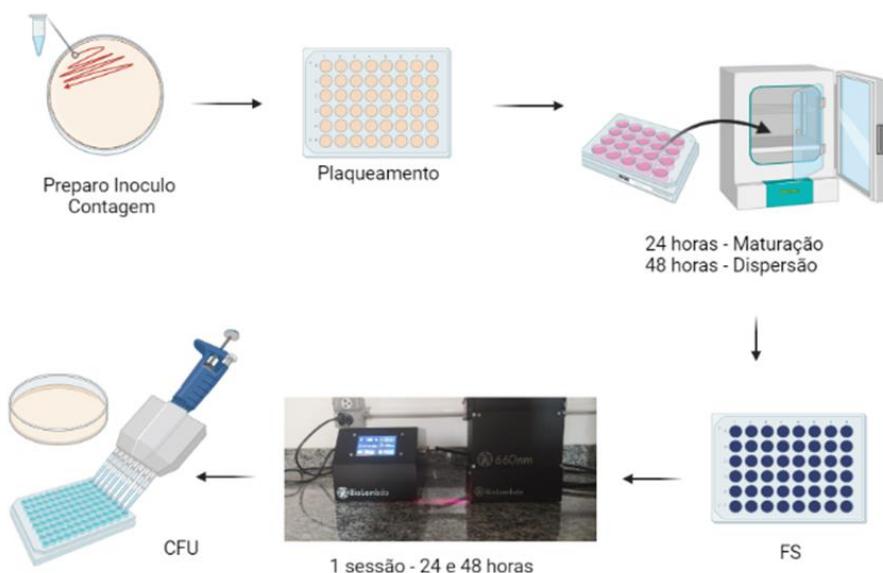


Figura 9: Metodologias dos ensaios de aPDT em Biofilme nos estágios de maturação e dispersão.

3.8 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de maturação com duas irradiações.

Uma placa de 48 poços foi tratada com Soro Fetal bovino por 24 horas. O Soro Fetal Bovino foi removido e 0,10 mL da suspensão de *C. albicans* (5.0×10^7 células/mL, preparadas conforme item 3.4) foram adicionados aos poços, juntamente com 0,30 mL do meio Caldo Sabouraud Dextrose. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C, 50 RPM, para a formação do biofilme. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os biofilmes aderidos foram lavados com o tampão (PBS). Os biofilmes foram então expostos novamente às soluções FS a 50 mg/L (Água ou fórmula contendo SDS a 0,25%) sendo mantidos por 5 minutos no escuro. A irradiação foi realizada conforme parâmetros dosimétricos item 3.1. Imediatamente após a primeira irradiação, foi retirado o FS, lavado com PBS e adicionado uma nova solução de FS (nas mesmas condições da primeira irradiação), mantidos 5 minutos no escuro, e após irradiados novamente (repetindo a mesma dosimetria da primeira aplicação). Após os tratamentos, as soluções foram removidas, os biofilmes foram lavados com PBS e rompidos por múltiplas pipetagens para realização do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias (item 3.5.1) (Figura 10).

3.9 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão com duas irradiações.

Uma placa de 48 poços foi tratada com Soro Fetal bovino por 24 horas. O Soro Fetal Bovino foi removido e 0,10 mL da suspensão de *C. albicans* (5.0×10^7 células/mL, preparadas conforme item 3.4) foram adicionados aos poços,

juntamente com 0,30 mL do meio Caldo Sabouraud Dextrose. A placa foi incubada por 48 horas a 37 °C, 50 RPM, para a formação do biofilme. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os biofilmes aderidos foram lavados com o tampão (PBS). Os biofilmes foram então expostos novamente às soluções FS a 50 mg/L (Água ou fórmula contendo SDS a 0,25%) sendo mantidos por 5 minutos no escuro. A irradiação foi realizada conforme parâmetros dosimétricos item 3.1. Imediatamente após a primeira irradiação, foi retirado o FS, lavado com PBS e adicionado uma nova solução de FS (nas mesmas condições da primeira irradiação), mantidos 5 minutos no escuro, e após irradiados novamente (repetindo a mesma dosimetria da primeira aplicação). Após os tratamentos, as soluções foram removidas, os biofilmes foram lavados com PBS e rompidos para realização do ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias (item 3.5.1) (**Figura 10**).

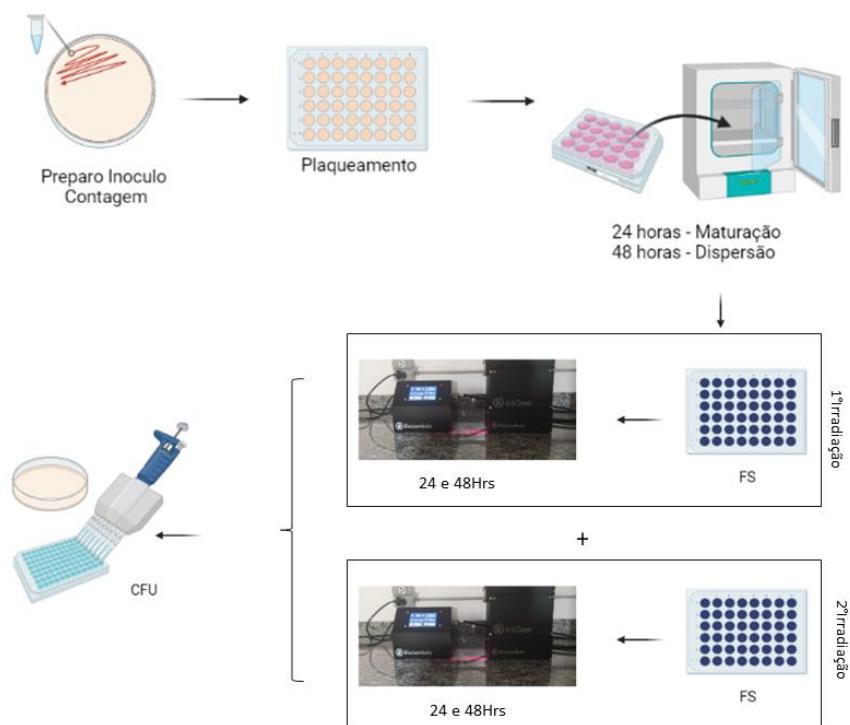


Figura 10: Metodologias dos ensaios de duas irradiações de aPDT em Biofilme nos estágios de maturação e dispersão.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada e os gráficos preparados por meio do software Prism versão 6.0. O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para avaliar a normalidade dos dados. Os dados de log UFC/mL foram expressos como média \pm desvio padrão, e o teste two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni, foi aplicado para comparar os valores dos diferentes tratamentos antimicrobianos. Todos os experimentos foram realizados em triplicada e 3 experimentos independentes ($n=9$).

4. Resultados

4.1 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM antes da fase de adesão de biofilmes (suspensão)

Na **Figura 11** estão apresentados os dados referentes à avaliação do efeito no escuro dos diferentes grupos de tratamento conforme metodologia descrita no item 3.6.

Quando comparamos CT sem SDS (água) e CT SDS observamos uma leve, porém significativa, diminuição no valor do logaritmo das UFC/mL, porém significativa, de aproximadamente 0,77 ($p=0,0001$), de forma que o SDS apresenta algum efeito citotóxico. Considerando os FSs veiculados em água, não houve diferença em relação ao grupo CT água. Ao comparar o CT água com os FSs água não foi observado diferença estatística, bem como entre os FSs comparados entre si.

Ao comparar CT com SDS e os FSs veiculados em SDS observamos diminuição significante nos valores de logaritmo de UFC/mL para AA e DMAM respectivamente de 0,36 ($p=0,0007$) e 0,54 ($p=0,0001$). Apesar de estatisticamente significantes, estas diferenças menores que 1 logaritmo (menos de 90%) de UFC/mL podem ser consideradas irrelevantes visto que as leveduras vão retomar a proliferação e restabelecer os níveis rapidamente.

Ao comparar todos os FSs veiculados em SDS entre si, observamos diferença significante nos valores em logaritmo das UFC/mL nas comparações AM x DMAM e AB x DMAM atingindo diferenças de 0,32 ($p=0,0060$) e 0,40 ($p=0,0001$) logaritmo de UFC/mL, respectivamente. Novamente, foram observadas diferenças menores que 1 Log, de modo que acredita-se que nas

condições no escuro todos os FSs estudados se comportam de forma muito similar.

A presença do SDS não causou aumento considerável na toxicidade dos FSs, visto que os FSs veiculados em SDS causaram redução significante de 1,02 log de UFC/mL para AM, 1,0 log de UFC/mL para AA, 0,91 log de UFC/mL para AB e 1,04 log de UFC/mL para DMAM quando comparados ao mesmo FS sem SDS. Nota-se que estes valores são muito próximos da toxicidade encontrada para o SDS (CT SDS). Portanto, em suspensão todos os FSs associados ao SDS não apresentaram toxicidade considerável, demonstrando que sem a aplicação do LED os FSs são incapazes de inativar *C. albicans*.

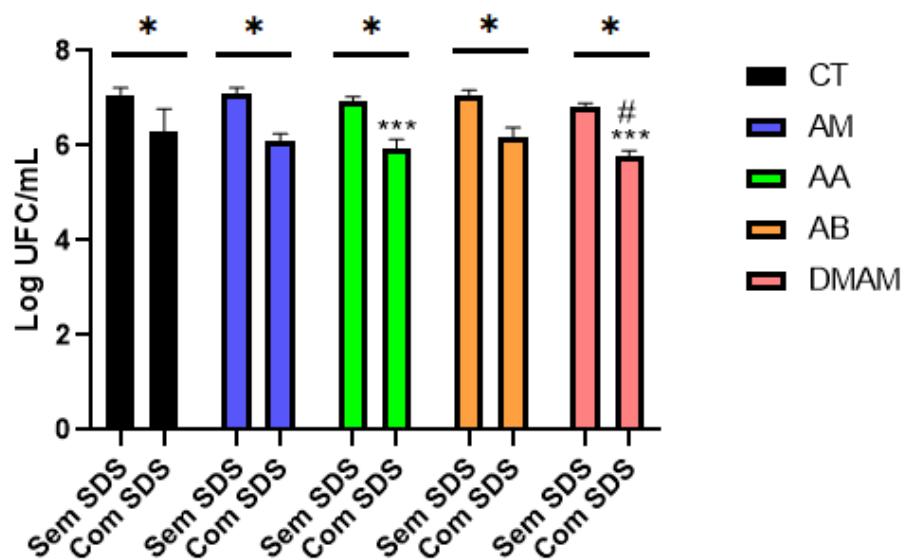


Figura 11: Avaliação do efeito dos fotossensibilizadores com AM, AA, AB e DMAM em suspensão antes da adesão no escuro. Dados apresentados como média \pm DP, $n=3$, 03 experimentos independentes, n total de 9, * $p<0,05$, *** $p<0,05$ em relação ao CT SDS, # $p<0,05$ em relação ao AM e AB SDS.

Na **Figura 12** estão apresentados os dados referentes às UFC/mL dos biofilmes formados após o tratamento das leveduras por aPDT descrito no desenho experimental utilizando os grupos de tratamento conforme o item 3.5.

Quando comparamos CT sem SDS (água) e CT SDS observamos uma leve diminuição no valor do logaritmo das UFC/mL, de aproximadamente 0,77 ($p=0,0001$), de forma que o SDS apresenta algum efeito citotóxico.

Comparando todos os FSs veiculados em SDS entre si, não observamos diferença significante nos valores em logaritmo das UFC/mL, visto que todos os FSs inativaram o fungo causando redução maior que 3 logaritmos em relação ao grupo controle ($p=0,0001$). A presença do SDS otimizou a aPDT visto que os FSs veiculados em SDS causaram redução significante e maior que 3 logaritmos quando comparados ao FS sem SDS ($p=0,0001$). Portanto, em suspensão todos os FS associados ao SDS são capazes de inativar a *C. albicans* enquanto na ausência de SDS (veiculado em água) o mesmo não ocorre.

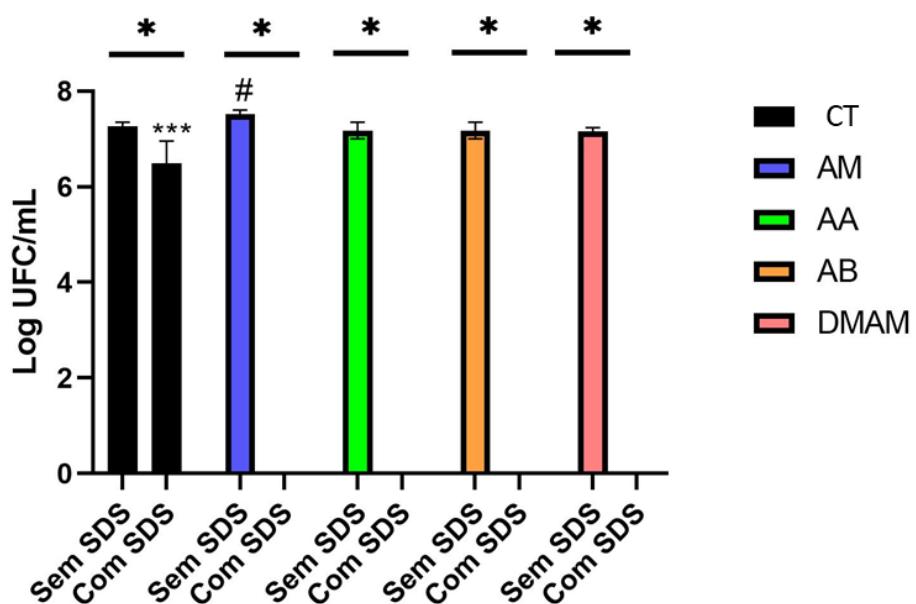


Figura 12: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em suspensão antes da adesão. Dados apresentados como média \pm DP, $n=3$, 03

experimentos independentes, n total de 9, * $p<0,05$, *** $p<0,05$ em relação aos demais tratamentos com SDS, # $p<0,05$ em relação aos outros FS sem SDS.

4.2 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme na fase de maturação

Na **Figura 13** estão apresentados os dados obtidos após a aPDT em biofilmes em fase de maturação com crescimento no período de 24 horas, descrito no desenho experimental utilizando os grupos de tratamento conforme o item 3.7.

Na comparação do CT e FSs veiculados em água, não ocorreu diferenças significantes nos valores de logaritmo de UFC/mL de forma que não houve indução de morte celular no biofilme na fase de maturação por aPDT com FSs em água.

A aplicação do SDS 0,25% ao biofilme (CT SDS) não afetou a viabilidade das células, vide que ao compararmos CT água com o CT SDS não observamos diferença significante nos valores de logaritmo de UFC/mL.

A comparação dos valores de logaritmo de UFC/mL de todos os FSs veiculados em SDS em relação ao CT SDS, bem como a comparação dos FSs entre si, não evidenciou diferença significante.

Em relação a comparação dos FSs veiculados em água com o mesmo FS aplicado em SDS foi observada pequena redução no logaritmo de UFC/mL de 0,48 ($p=0,0034$), 0,42 ($p=0,01$), 0,49 ($p=0,003$) e 0,63 ($p=0,0001$) para AM, AA, AB e DMAM respectivamente. Estes dados sugerem que aPDT não é capaz de inativar o biofilme em fase de maturação, mesmo diante da veiculação em SDS.

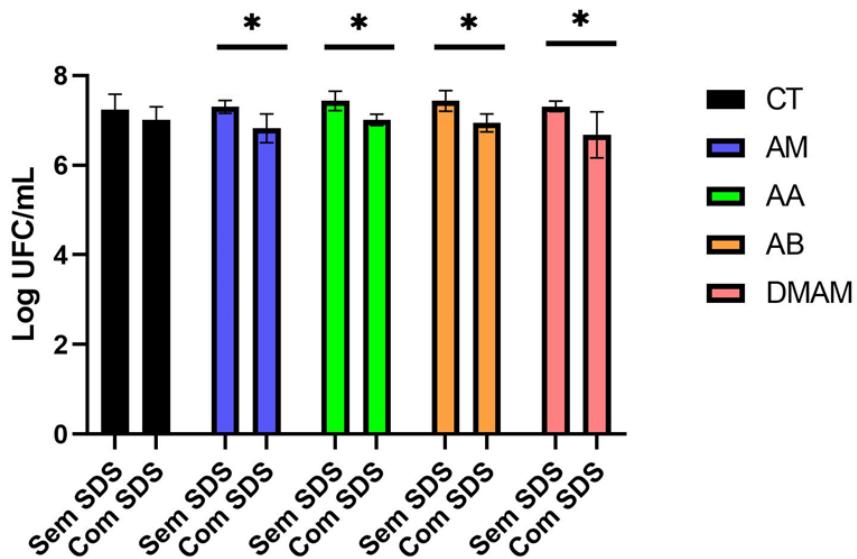


Figura 13: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em biofilme na fase de maturação. Crescimento do biofilme durante 24 horas a 37 °C, 50 RPM. Dados apresentados como média \pm DP, 3 experimentos independentes, N=9, *p<0,05.

4.3 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme na fase de maturação com duas irradiações.

Na **Figura 14** estão apresentados os dados obtidos após duas sessões de aPDT em biofilmes em fase de maturação com crescimento no período de 24 horas, descrito no desenho experimental utilizando os grupos de tratamento e submetidos à 2 irradiações sucessivas, conforme o item 3.9.

Na comparação do CT e FSs veiculados em água, somente foi observada redução significante de 0,18 (p=0,0323) nos valores de logaritmo de UFC/mL para AA enquanto não ocorreu diferenças significantes para AM, AB e DMAM. Desta forma pode-se considerar que não houve indução de morte celular no biofilme em fase de maturação com 2 irradiações sucessivas quando os FSs foram veiculados em água.

A aplicação do SDS 0,25% ao biofilme (CT SDS) não afetou a viabilidade das células, vide que ao compararmos CT água com o CT SDS, não observamos diferença significante.

A comparação dos valores de logaritmo de UFC/mL do AM veiculado em SDS mostrou redução 0,42 ($p=0,0409$) em comparação ao CT SDS. Por outro lado todos os demais FSs veiculados em SDS em relação ao CT SDS, bem como os FSs veiculados em SDS comparados entre si, não evidenciou diferença significante.

Em relação a comparação dos FSs veiculados em água com o mesmo FS em SDS observa-se redução de 0,91 ($p=0,0001$), 0,66 ($p=0,0004$), 0,83 ($p=0,0001$) e 0,63 ($p=0,0001$) nos valores de logaritmo de UFC/mL, para AM, AA, AB e DMAM, respectivamente. Estes dados mostram que a aPDT não foi capaz de romper o biofilme e/ou causar morte celular no biofilme maduro, mesmo quando os FSs foram associados ao SDS e utilizadas duas irradiações.

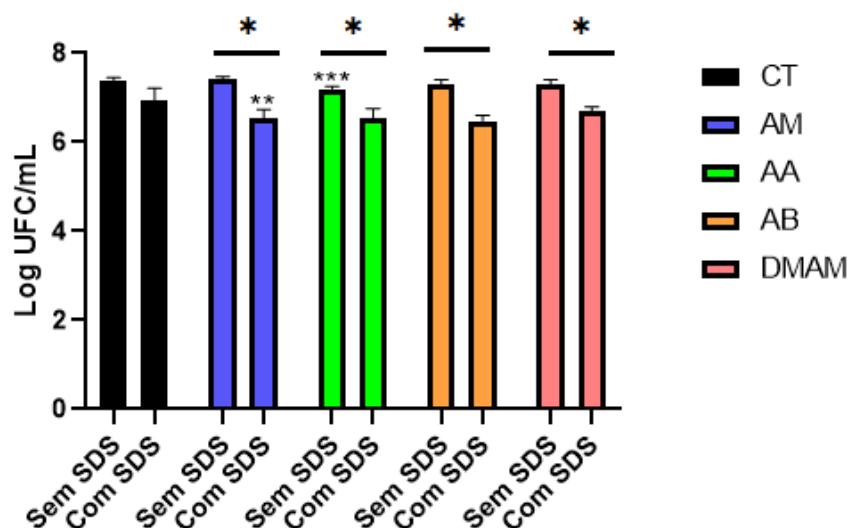


Figura 14: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em biofilme na fase de maturação com duas irradiações. Crescimento do biofilme durante 24 horas a 37 °C, 50 RPM. Dados apresentados como média \pm

DP, 3 experimentos independentes, N=9, * $p<0,05$, ** $p<0,05$ em relação ao CT SDS, *** $p<0,05$ em relação ao CT sem SDS.

4.4 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão

Na **Figura 15** estão apresentados os dados obtidos após a aPDT em biofilmes em fase de dispersão com crescimento por período de 48 horas, descrito no desenho experimental utilizando os grupos de tratamento conforme o item 3.8.

Quando comparamos CT sem SDS (água) e CT SDS observamos uma leve diminuição no valor do logaritmo das UFC/mL, de aproximadamente 0,89 ($p=0,0001$), de forma que o SDS apresenta algum efeito citotóxico.

Ao comparar os valores de logaritmo das UFC/mL do grupo CT água com os FSs veiculados em água foi evidenciada redução significante, sendo as diferenças do CT em relação ao AM de 0,90 ($p= 0,0008$), ao AA de 0,61 ($p=0,0001$), ao AB de 0,54 ($p=0,0001$) e ao DMAM de 0,36 ($p=0,0001$).

Não foram encontradas diferenças significantes entre os valores de UFC/mL quando se compara os grupos CT SDS e os FSs veiculados em SDS, da mesma forma que não foram observadas diferenças nos valores de UFC/mL quando comparados os FSs entre si.

Na comparação FS veiculados em água e o mesmo FS em SDS, observou-se uma diferença significante nos valores logaritmos de UFC/mL, sendo a diferença em relação ao AM 0,51 ($p= 0,0001$), AA 0,74 ($p= 0,0001$), AB 0,78 ($p=0,0001$) e DMAM 1,04 ($p =0,0001$). Isso mostra que quando associado ao SDS o FS não é capaz de romper e/ou inativar os biofilmes em fase de dispersão.

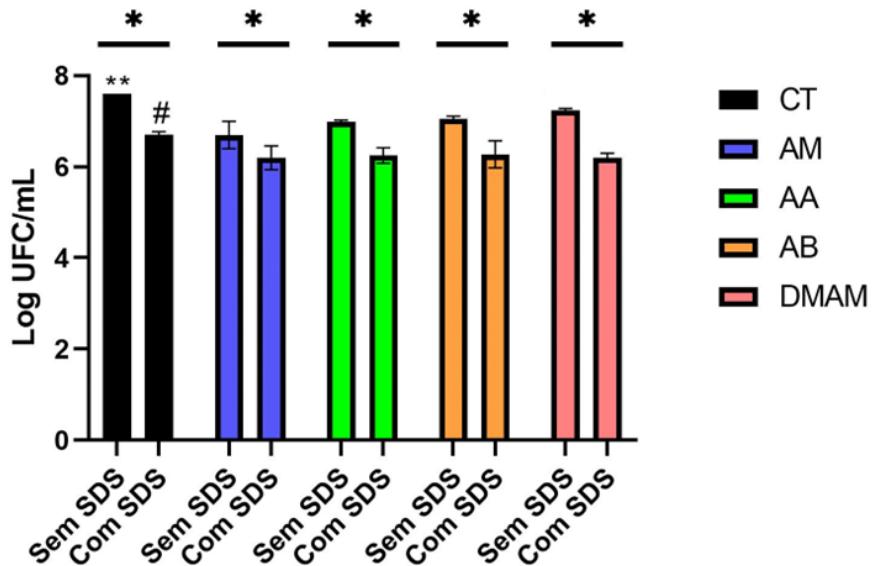


Figura 15: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM em inativação de biofilme por aPDT na fase de dispersão. Crescimento do biofilme durante 48 horas a 37 °C, 50 RPM. Dados apresentados como média \pm DP, 3 experimentos independentes, $N=9$, $^*p<0,05$, $^{**}p<0,05$ em relação aos tratamentos com FS sem SDS, $^{\#}p<0,05$ em relação aos tratamentos com FS em SDS.

4.5 Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão com duas irradiações

Na **Figura 16** estão apresentados os dados obtidos após a aPDT em biofilmes em fase de dispersão com crescimento no período de 48 horas, descrito no desenho experimental utilizando os grupos de tratamento e submetidos à 2 irradiações sucessivas, conforme o item 3.10.

Na comparação do CT e FSs veiculados em água, ocorreu diferenças significantes no valor do logaritmo de UFC/mL para AM, AA, AB e DMAM de 0,34, 0,57, 0,16 e 0,22 respectivamente. Visto que a diferença em logaritmo foi menor que 3, não houve inativação celular no biofilme em fase de dispersão por ação aPDT com FSs em água, mesmo com duas irradiações.

A aplicação de SDS 0,25% ao biofilme (CT SDS) causou redução de viabilidade das células, vide que ao compararmos CT água com o CT SDS, observamos diferença significante nos valores logaritmos de UFC/mL de 0,89 ($p=0,0001$).

A comparação dos valores de logaritmo de UFC/mL de todos os FSs veiculados em SDS em relação ao CT SDS, observamos a inativação do biofilme quando usados AM, AA e DMAM, enquanto AB causou redução 1,13 log UFC/mL ($p=0,0001$). Quando comparados entre si, os efeitos do AB veiculado em SDS são显著mente menores que os demais FS.

Estes resultados mostram que em fase de dispersão do biofilme os FS AM, AA e DMAM associados ao SDS são capazes de inativar a *C. albicans* enquanto na ausência de SDS (veiculado em água) o mesmo não ocorre.

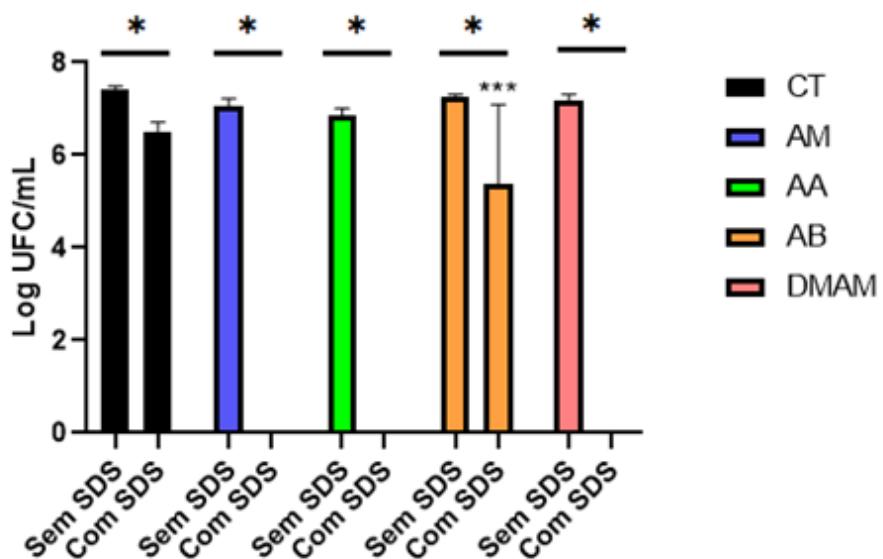


Figura 16: Avaliação do efeito da aPDT com AM, AA, AB e DMAM na inativação de biofilme em fase de dispersão com duas irradiações. Crescimento do biofilme durante 48 horas a 37 °C, 50 RPM, com duas irradiações. Dados apresentados como média \pm DP, 4 experimentos

*independentes, N=12, *p<0,05, **p<0,05 em relação ao CT com SDS, ***p<0,05 em relação aos demais fotossensibilizadores com SDS.*

5. Discussão

Este estudo avaliou a eficácia da aPDT com os fenotiazínicos AM, AA, AB e DMAM (50 mg/L) em diferentes etapas do crescimento do biofilme, investigando o papel do controle da agregação dos FSs.

Quando foi avaliado o efeito da aPDT antes da fase de aderência das leveduras, os ensaios foram realizados em suspensão e avaliada a capacidade de formação do biofilme após o tratamento. Os dados no escuro mostraram ausência de toxicidade dos FSs veiculados em água e para os FSs veiculados em SDS houve uma redução menor ou igual a 1 Log de UFC/mL, similar ao efeito do SDS usado individualmente (CT SDS). Nesta condição os FSs veiculados em água ou SDS, não foram capazes de inibir a aderência das células e/ou impedir a formação do biofilme.

Collina e colaboradores⁵⁷ ao avaliarem a toxicidade dos FSs no escuro notaram que mesmo aumentando o período de incubação de 1 a 20 minutos, não havia redução nos valores de UFC/mL em cultura planctônica de *C. albicans*. Dados semelhantes foram observados em outro trabalho³⁵. Além disso, também já foi visto anteriormente que a associação do MB ao SDS no escuro leva a toxicidade similar ao do SDS, visto que o SDS leva a uma sensibilização do fungo antes da adesão.

Ao avaliar a associação dos FSs com SDS, ativados por LED em biofilmes em fase de adesão, observou-se a inativação da cepa. Leonel e colaboradores⁵⁶ com uma concentração de AM de aproximadamente metade da que foi usada neste trabalho (0,02 mg/L) e exposição radiante de 30J/cm² (também metade da utilizada neste trabalho) porém com irradiação 7 vezes maior relataram redução menor que 1 Log na habilidade de formar biofilmes (que equivalem a 90% de

diminuição na formação dos biofilmes). O semelhante foi observado por Hurtado e colaboradores ³⁵, no qual relataram que para inibir o crescimento do biofilme foi necessário uma maior concentração do AM e maior a exposição radiante, quando aplicaram apenas uma dose da aPDT,

Da mesma forma, estes dados corroboram com dados anteriores do grupo ^{53,57,71} que mostraram que o SDS potencializava a ação antimicrobiana da aPDT em suspensão, para todos os FSs estudados. Apesar de no trabalho anterior do grupo ter sido observada diferença entre os efeitos dos diferentes FSs, neste estudo não foi verificada esta diferença. Isso porque foram utilizados parâmetros (concentração de FS, exposição radiante e irradiância) mais elevados. Considerando que o biofilme é mais resistente à ação dos antimicrobianos, e que em trabalho anterior do grupo⁵⁷ foi verificado ser importante aumentar a concentração de 20 mg/L para 50 mg/L para haver efeito antimicrobiano no modelo de biofilme. Apesar de neste experimento ainda se tratar de um ensaio em suspensão, devido à necessidade de comparação com os demais ensaios que seriam em biofilmes, optou-se por padronizar esta concentração mais alta, de modo que a inativação foi completa nesta condição. Também foram utilizados irradiancia e exposição radiante maiores ($37,3 \text{ mW/cm}^2$ e $60,4 \text{ J/cm}^2$) do que aquelas utilizadas nos estudos anteriores do grupo ($2,6 \text{ mW/cm}^2$ e $4,7 \text{ J/cm}^2$) se mostrava efetiva para suspensão, porém mesmo na presença de SDS apenas 1Log era reduzido nas unidades formadoras de colônias em biofilmes. Desta forma, acredita-se que para que fosse possível observar diferenças entre os FSs ao menos o tempo de irradiação poderia ser diminuído (e consequentemente, um menor valor de exposição radiante).

Na fase de maturação do biofilme, a matriz extracelular protetora se forma, e a estrutura passa a ter alta resistência a agressões químicas e físicas e alta resistência a diversos antifúngicos. Diante disso ao avaliar biofilmes em fase de maturação, observamos que mesmo o uso dos FSs em SDS não foi capaz de romper o biofilme ou reduzir o número de células viáveis, tal qual o seu uso em água. Acredita-se que o menor efeito antimicrobiano da aPDT observado em comparação às leveduras esteja relacionado às diferenças estruturais, como por exemplo a presença da matriz extracelular.

Da mesma forma, em biofilmes em fase de dispersão (48h) quando os FSs foram veiculados em SDS também não foram capazes de romper o biofilme ou reduzir o número de células viáveis, tais quais o seu uso em água. Outro trabalho que avaliou biofilmes em dispersão (48h de crescimento), também relataram maiores dificuldades em causar inativação do biofilme em dispersão corroborando com os dados deste trabalho ⁵⁴.

Sharma e colaboradores ⁷², sugere que a composição química da matriz extracelular dos biofilmes, impedem que os antifúngicos penetrem nas células, permitindo que as células cresçam e se propaguem dentro de um biofilme sem interferência ⁷². Fazendo uma analogia com estes achados, os FSs também devem apresentar dificuldade de penetração no biofilme diminuindo a eficácia aPDT.

Adicionalmente em termos de composição química, sabe-se que os biofilmes apresentam maior conteúdo lipídico que as leveduras⁷³. Considerando a ação oxidativa da aPDT nas diferentes fases de crescimento de *C.albicans* os principais alvos durante a fase latência são as proteínas e ácidos nucleicos enquanto em fase estacionária são polissacarídeos e lipídeos⁷⁴. Neste sentido,

as espécies reativas de oxigênio produzidas pela ação da aPDT, em especial o oxigênio singlete que atua em insaturações, vai ter menor possibilidade de ação nos biofilmes em fase estacionária cujos lipídeos apresentam menor número de insaturações⁷³.

Freire colaboradores ⁷⁵ buscaram associar AM (100 μ M) ao iodeto de potássio (100 mM) para potencializar o efeito da aPDT em biofilmes maduros de *C. albicans* *in vitro*. A melhor redução logarítmica de UFC/mL em biofilme foi de 2,31 log10, obtida nos parâmetros de 31,8 mW/cm²; 12,7 J/cm²; 40 J. Mesmo usando um potencializador, a aPDT não foi capaz de inativar os biofilmes maduros. Outros trabalhos que avaliaram os efeitos da aPDT em diferentes etapas de formação do biofilme também relataram maiores dificuldades em causar inativação do biofilme do que reduzir a sua formação, corroborando com os dados deste trabalho ^{2,56}.

Outros trabalhos relataram uso de aPDT como agente FS para aPDT , veiculando em meios como PBS, água ou soro fisiológico sendo que a inativação não foi alcançada ou foram necessários maiores valores de exposição radiante para um tratamento efetivo ^{38,53,60,76}. No caso do soro fisiológico⁷⁶ sabe-se que o meio com alta forma iônica aumenta a formação de dímeros e agregados maiores que podem reduzir a eficácia da aPDT. Sabino e colaboradores³⁸ utilizaram MB em PBS para inativação de *C.albicans* sendo que a cepa se mostrou resistente tanto aos fármacos como à aPDT, sendo necessária maior exposição radiante. Mendeles-Celis e colaboradores⁶⁰ e Torres-Hurtado e colaboradoes³⁵ observaram resultados semelhantes porém foram utilizadas exposições radiantes menores com 2 ou 3 aplicações sequenciais de aPDT para efeito inibitório do crescimento.

Considerando que trabalhos como de Melendez-Celiz⁶⁰ e Torres-Hurtado³⁵ e seus colaboradores mostraram que sessões repetidas de aPDT, mesmo com dosimetrias menores, se mostram mais eficazes em seu efeito antimicrobiano e diante do insucesso da aPDT com fenotiazínicos, mesmo quando veiculados em SDS nos biofilmes maduros e em fase de dispersão, optou-se por realizar a aplicação de 2 sessões de aPDT ao biofilme.

Em relação aos efeitos antimicrobianos dos diferentes FSs, quando avaliados em associação ao SDS antes da aderência do biofilme não foram observadas diferenças entre os FSs considerando os parâmetros utilizados (concentração, exposição radiante e irradiação). As diferenças poderiam ser observadas com uso de doses subletais.

Já quando considerado o efeito da aPDT no biofilme em fase de dispersão, quando os FSs foram utilizados em combinação com SDS e com 2 irradiações, verificou-se menor efeito antimicrobiano do AB. Estes achados não corroboram com dados anteriores do grupo que mostraram, em cultura planctônica, que AA apresentava menor efeito antimicrobiano que AB, AM é muito menor que DMAM⁵³. O que pode ter ocorrido é que no estudo anterior foram utilizadas concentrações de 20 mg/L enquanto neste, a concentração final dos FSs foi de 50 mg/L, de forma que é possível que nesta concentração, em associação ao SDS o AB apresente maior agregação que AA.

No biofilme em fase de maturação, 2 sessões de aPDT ainda não foram suficientes para reduzir ou inativar o biofilme, de forma similar ao que foi observado para apenas 1 irradiação. Por outro lado ao serem aplicadas 2 sessões de aPDT ao biofilme em fase de dispersão, houve pequena ação antimicrobiana quando os FSs são aplicados em água, enquanto houve

inativação quando AM, AA e DMAM foram veiculados em SDS. No caso do uso do AB em SDS houve redução significante em relação ao grupo CT SDS.

Hipotetiza-se que o efeito pronunciado no biofilme em fase de dispersão pode ser por consequencia de uma sensibilização do biofilme na primeira aplicação , desestruturando levemente a matriz extracelular e inativando as leveduras que estavam sendo dispersas, enquanto a segunda aplicação o FS foi capaz de penetrar mais profundamente na matriz, levando por consequencia aPDT possuir um efeito mais pronunciado. Observa-se que em biofilmes em fase de dispersão, por estar liberando células de levedura para os arredores^{2,6}, pode apresentar uma matriz menos estruturada, mais sensível, facilitando assim a penetração e incorporação dos FSs possibilitando a inativação dos biofilmes, fato que não ocorre em biofilmes em fase de maturação na qual a matriz se encontra mais forte para proteger os biofilmes contra agressões químicas e físicas ^{6,7}.

Durante a formação do biofilme no hospedeiro, os micro-organismos costumam se comportar como uma comunidade, na qual as estruturas têm uma superfície embebida de matriz polimérica extracelular, produzida pelas próprias células da população microbiana, esta estrutura também favorece uma colonização mais persistente, resistindo ao sistema imune do hospedeiro, aumentando sua resistência e favorecendo a troca genética ^{12,77,78}. Acredita-se que em biofilmes maduros esta estrutura está bem definida, protegendo assim a comunidade dos biofilmes de forma mais intensa, corroborando assim com nossos achados, no qual em biofilmes maduros apresentaram grande resistência.

Clinicamente o uso de múltiplas sessões por semana mostra-se promissor: 45% de redução em candidíase oral⁷⁹ e 89,13% de redução em acne vulgar⁸⁰ com aplicações 3 vezes por semana.

Outros trabalhos^{16,30,79} sugerem aplicações semanais de aPDT, porém nenhum destes sugerem mais de uma aplicação na mesma sessão. Os dados obtidos neste trabalho sugerem vantagens do uso de ao menos duas aplicações, porém se faz necessário rever a dosimetria, avaliando os parâmetros mínimos necessários e o número de aplicações repetidas, de forma que novos trabalhos podem se fazer necessários neste âmbito.

6. Conclusões

Este trabalho mostrou que a ação da aPDT tem eficácia em uma única sessão quando realizada antes da instalação do biofilme de *C. albicans* e com os FSs veiculados em SDS. Os biofilmes em fase de maturação e em fase de dispersão respondem de forma similar a uma aplicação de aPDT não havendo redução microbiana, porém quando utilizadas 2 aplicações os biofilmes em fase de dispersão são inativados quando os FSs são veiculados em SDS. A eficácia dos diferentes FSs veiculados em SDS, antes da formação do biofilme é similar enquanto no biofilme em dispersão, quando são realizadas 2 irradiações somente o AB apresentou menor eficácia.

7. Referências

1. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016;18(5):310–21.
2. Bapat P, Singh G, Nobile CJ. Visible lights combined with photosensitizing compounds are effective against *candida albicans* biofilms. *Microorganisms.* 2021;9(3):1–20.
3. Vieira AJH, Santos JI dos. Mechanisms of resistance of *Candida albicans* to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin. *Rev RBAC.* 2016;
4. Ambrosio JAR, Pinto BC dos S, Godoy D da S, Carvalho JA, Abreu A da S, Silva BGM da, et al. Gelatin nanoparticles loaded methylene blue as a candidate for photodynamic antimicrobial chemotherapy applications in *Candida albicans* growth as a candidate for photodynamic antimicrobial. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019;30(14):1356–73.
5. Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence.* 2012;3(3):251–61.
6. Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol.* 2021;131(1):11–22.
7. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:71–92.
8. Moraes MN, Silveira WC da, Teixeira LEM, Araújo ID. Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials. *Rev Med Minas Gerais.* 2013;23(1):96–101.
9. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* 2010;6(3):e1000828.
10. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 2011;10(9):1173–82.
11. Vedyappan G, Rossignol T, D'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):2096–111.

12. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CA de S, Jacomassi DP, et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011;87(17):895–903.
13. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(18026):1–20.
14. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(1):19–31.
15. Setlik J, Silva R de C. Photodynamic therapy as an alternative treatment for non-melanoma skin cancer. *Rev Saúde e Desenvolv*. 2015;7(4):195–206.
16. Sellera FP, Gargano RG, Pogliani FC. Photodynamic therapy: a review. *Rev Educ Contin em Med Veterinária e Zootec do CRMV-SP*. 2014;12(1):6–13.
17. Issa MCA, Fassini A, Boechat M, Ferolla ACJ. Photodynamic therapy in photoaging: literature review. *Surg Cosmet Dermatol* 2016;8(4). 2016;8(4):510–6.
18. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc*. 2013;46(1):24–9.
19. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2009;96(1):1–8.
20. Longo JPF, Lozzi SP, Azevedo RB. Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment. *Rev Gaúcha Odontol*. 2011;59(0):51–7.
21. Chen Y, Li G, Pandey R. Synthesis of Bacteriochlorins and Their Potential Utility in Photodynamic Therapy (PDT). *Curr Org Chem*. 2005;8(12):1105–34.
22. Pucelik B, Sułek A, Dąbrowski JM. Bacteriochlorins and their metal complexes as NIR-absorbing photosensitizers: properties, mechanisms, and applications. *Coord Chem Rev*. 2020;416.
23. Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20523–59.
24. Diniz IMA, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato

- MRL, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: A promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2015;12(3):511–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.04.006>
25. Ichinose-Tsuno A, Aoki A, Takeuchi Y, Kirikae T, Shimbo T, Lee M, et al. Antimicrobial photodynamic Therapy supresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health*. 2014;14:152–62.
26. Rodrigues GB, Dias-Baruffi M, Holman N, Wainwright M, Braga GUL. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(2):141–9.
27. Kasimova K, Sadasivam M, Landi G, Sarna T, Hamblin M. Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. *Photochem Photobiol Sci*. 2014;13(11):1541–8.
28. Tardivo JP, Wainwright M, Baptista MS. Local clinical phototreatment of herpes infection in Sao Paulo. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012;9(2):118–21.
29. Pereira CA, Romeiro RL, Costa ACBP, MacHado AKS, Junqueira JC, Jorge AOC. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: An in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2011;26(3):341–8.
30. El-Khordagui L, El-Sayed N, Galal S, El-Goweli H, Omar H, Mohamed M. Photosensitizer-eluting nanofibers for enhanced photodynamic therapy of wounds: A preclinical study in immunocompromized rats. *Int J Pharm*. 2017;520(1–2):139–48.
31. Winkler K, Simon C, Finke M, Bleses K, Birke M, Szentmáry N, et al. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by chlorin e6 and red light ($\lambda=670\text{nm}$). *J Photochem Photobiol B-Biology*. 2016;162:340–7.
32. Barra F, Roscetto E, Soriano A, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni G, et al. Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination to Fight Biofilms and

- Resistant Surface Bacterial Infections. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):20417–30.
- 33. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(8):1518–26.
 - 34. Wainwright M. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8(3):280–91.
 - 35. Torres-Hurtado SA, Ramírez-Ramírez J, Larios-Morales AC, Ramírez-San-Juan JC, Ramos-García R, Espinosa-Texis AP, et al. Efficient in vitro photodynamic inactivation using repetitive light energy density on *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:203–9.
 - 36. Dovigo LN, Pavarina AC, De Oliveira Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses.* 2011;54(2):123–30.
 - 37. Ogasawara K. *Candida albicans* Sterilization Using a Light-Emitting Diode and Methylene Blue. *Laser Ther.* 2018;27(4):257–63.
 - 38. Sabino CP, Wainwright M, Ribeiro MS, Sellera FP, Anjos C dos, Baptista M da S, et al. Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol.* 2020;208:1–9.
 - 39. Neto CF, Beatriz A, Niwa M. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações *. *2009;84(5):445–57.*
 - 40. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018;106(July):1098–107.
 - 41. Albani BA, Pen B, Leed NA, Paula NABG De, Pavani C, Baptista MS, et al. Marked Improvement in Photoinduced Cell Death by a New Tris-heteroleptic Complex with Dual Action: Singlet Oxygen Sensitization and Ligand Dissociation. *J Am Chem Soc.* 2014;136(49):17095–101.
 - 42. de Oliveira KT, de Assis FF, Ribeiro AO, Neri CR, Fernandes AU, Baptista MS, et al. Synthesis of Phthalocyanines-ALA Conjugates: Water-Soluble Compounds with Low Aggregation. *J Org Chem.* 2009;74(20):7962–5.
 - 43. Fernandes A, de Oliveira KT, Baptista MS, Bortoluzzi AJ, Iamamoto Y, Serra OA. Chlorin Photosensitizers Sterically Designed To Prevent Self-

- Aggregation. *J Org Chem.* 2011;76(21):8824–32.
44. Betoni Momo P, Pavani C, Baptista MS, Brocksom TJ, Thiago De Oliveira K. Chemical transformations and photophysical properties of meso-tetrathienyl-substituted porphyrin derivatives. *European J Org Chem.* 2014;2014(21):4536–47.
 45. Wainwright M, Antczak J, Baca M, Loughran C, Meegan K. Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2015;150:38–43.
 46. Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From Mitochondrial Function to Neuroprotection — an Emerging Role for Methylene Blue. 2017;
 47. Khan AY, Suresh Kumar G. Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes, azure A and azure B to double stranded RNA polynucleotides. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;152:417–25.
 48. Abdelaziz G, Shamsel-Din HA, Sarhan MO, Gizawy MA. Tau Protein Targeting Via Radioiodinated Azure A For Brain Theranostics: Radiolabeling, Molecular Docking, in vitro And in vivo Biological Evaluation. *J Label Compd Radiopharm.* 2020;63(1):33–42.
 49. de Souza BTL, Klosowski EM, Mito MS, Constantin RP, Mantovanelli GC, Mewes JM, et al. The photosensitiser azure A disrupts mitochondrial bioenergetics through intrinsic and photodynamic effects. *Toxicology.* 2021;455(March).
 50. Raimundo AFG, dos Santos KBP, Klosowski EM, de Souza BTL, Mito MS, Constantin RP, et al. The photodynamic and intrinsic effects of Azure B on mitochondrial bioenergetics and the consequences of its intrinsic effects on hepatic energy metabolism. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;35(April).
 51. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The Interaction of Lipopolysaccharides with Phenothiazine Dyes. *Lasers Surg Med.* 2003;33(5):311–9.
 52. Sampaio FJP, de Oliveira SCPS, Crugeira PJL, Monteiro JSC, de Araújo Fagnani SRC, Pepe IM, et al. aPDT using nanoconcentration of 1,9-dimethylmethylene blue associated to red light is efficacious in killing

- Enterococcus faecalis ATCC 29212 in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019;
53. 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>
54. Freire F, de Barros PP, da Silva Ávila D, Brito GNB, Junqueira JC, Jorge AOC. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. *Lasers Med Sci*. 2015;30(5):1511–8.
55. 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>
56. Leonel L de C, Carvalho ML, Silva BM da, Zamuner S, Alberto-Silva C, Costa MS, et al. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;26(January):316–23.
57. 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.
58. Baltazar L de M, Soares BM, Carneiro HCS, Ávila TV, Gouveia LF, Souza DG, et al. Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: In vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):354–61.
59. Souza RC, Jorge JCJ, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AOC. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2010;25(3):385–9.

60. Melendez-Celis U, Spezzia-Mazzocco T, Persheyev S, Lian C, Samuel I, Ramirez-San-Juan JC, et al. Organic light emitting diode for in vitro antimicrobial photodynamic therapy of *Candida* strains. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;36:1–7.
61. Lapena SAB de, Terra-Garcia M, Ward RA da C, Rossoni RD, Melo VMM, Junqueira JC. Enhancing effect of chitosan on methylene blue-mediated photodynamic therapy against *C. albicans*: A study in planktonic growth, biofilms, and persister cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;38.
62. 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.
63. Moreira LM, Lyon JP, Lima A, Codognoto L, Severino D, Baptista MS, et al. The Methylene Blue Self-aggregation in Water / Organic Solvent Mixtures : Relationship Between Solvatochromic Properties and Singlet Oxygen Production. *Orbital Electron J Chem.* 2017;9(4):279–89.
64. 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.
65. Kasha M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates. *Radiat Res.* 2012;178(2).
66. Pescitelli G, Bari D, Berova N. Application of electronic circular dichroism in the study of supramolecular systems. *Chem Soc Rev.* 2014;(45):5211–33.
67. Cannon JB. Pharmaceutics and Drug Delivery Aspects of Heme and Porphyrin Therapy. *Am Pharm Assoc.* 1993;82(5):435–46.
68. Blum A, Grosswei LI. Singlet oxygen geration by hematoporphyrin IX, uroporphyrin I and hematoporphyrin derivative at 546nm in phosphate buffer and in the presence of egg phosphatidylcholine liposomes. *Photochem Photobiol.* 1985;41(1):27–32.
69. Redmond RW, Land EJ, Truscott TG. Aggregation effects on the photophysical properties o porphyrins in relation to mechanisms involved in photodynamic therapy. *Adv Exp Med Biol.* 1985;193:293–302.
70. Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method

- for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*. 1997;23(4):648–50.
71. da Collina GA, Cabral FV, Monteiro CM, Machado GB, Gonçalves JMLA, Freire F, et al. The importance of combining methods to assess *Candida albicans* biofilms following photodynamic inactivation. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;38(December 2021):1–6.
 72. Sharma J, Rosiana S, Razzaq I, Shapiro RS. Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in candida pathogens. *J Fungi*. 2019;5(1):1–28.
 73. Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Roth MR, Welti R, Rouabchia M, et al. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. *Microbiology*. 2011;157(11):3232–42.
 74. Baptista A, Sabino CP, Núñez SC, Martin AA, Ribeiro MS. Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2017;(177):76–84.
 75. Freire F, Ferraresi C, Jorge AO, Hamblin MR. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2016;14:111–4.
 76. Fumes AAC, Romualdo PPC, Monteiro RRM, Watanabe E, Corona SAMS, Borsatto MCM. Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial photodynamic therapy with diode laser. *Lasers Med Sci*. 2018;33(1):67–73.
 77. Donlan RM, Costerton JW, Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167–93.
 78. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol*. 2006;188(10):3572–81.
 79. Mima EGDO, Pavarina AC, Silva MM, Ribeirão DG, Vergani CE, Kurachi C, et al. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: Five cases. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2011;112(5):602–8.
 80. Dong Y, Zhou G, Chen J, Shen L, Jianxin Z, Xu Q, et al. A new LED device

used for photodynamic therapy in treatment of moderate to severe acne vulgaris. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:188–95.