UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

MEDICINA-BIOFOTÔNICA

FABIANA DIVINA MAGALHÃES

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O (BuTBO) PARA INATIVAÇÃO DE *Candida albicans*

São Paulo, SP

2024

FABIANA DIVINA MAGALHÃES

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O (BuTBO) PARA INATIVAÇÃO DE *Candida albicans*

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Medicina – Biofotônica

Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates

São Paulo, SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Divina Magalhães, Fabiana.

Efeito Da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Mediada Por Butil Azul De Toluidina O (BuTBO) Em *Candida albicans*/ Fabiana Divina Magalhães. 2024.

45 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates.

1. *Candida albicans*. 2. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. 3. Butil Azul De Toluidina O (BuTBO).

I. Prates, Renato Araujo. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 09 de dezembro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Fabiana Divina Magalhães

Título da Tese: "Terapia fotodinâmica antimicrobiana com butil azul de toluidina O (BuTBO) para inativação de *Candida albicans*".

Presidente: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE

Membro: PROFª. DRª. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA

Membro: PROF. DR. HENRIQUE ROMAN RAMOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me proporcionou força e sabedoria ao longo de toda a jornada.

À Universidade Nove de Julho, pela valiosa oportunidade de realizar meu Doutorado. Ao professor Renato Araujo Prates por toda a paciência e dedicação, contribuindo com seus ensinamentos e experiências, auxiliando a moldar este momento tão especial na minha trajetória acadêmica.

Por último, mas não menos importante, sou grata à minha família que sempre esteve ao meu lado, apoiando e incentivando esse meu propósito. Sem vocês, essa conquista não seria possível.

RESUMO

Candida albicans é uma das infecções fúngicas mais comuns em humanos, atuando como microbiota normal e patógeno oportunista, colonizando locais como pele, boca, trato gastrointestinal e vagina. Em pessoas saudáveis, é detectada na saliva e mucosa oral em cerca de 40% dos casos, estando associada à doença periodontal. Além disso, a infecção por *C. albicans* pode desencadear inflamação mediada por Th17, destacando a necessidade de tratamentos eficazes e duradouros. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) é promissora, utilizando fotossensibilizadores ativados por luz para inibir/matar microrganismos. O presente estudo investigou o efeito antimicrobiano do aPDT mediado por Butil Azul De Toluidina O (BuTBO) em *C. albicans*. Utilizando a cepa *C. albicans* ATCC 90028, as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose e a eficácia do BuTBO foi avaliada em comparação com grupos de controle. Os resultados demonstraram que a irradiação sem fotossensibilizador não foi eficaz no combate a *C. albicans* ($p>0,05$). A partir de 2 min de irradiação, foi observada redução da carga microbiana, com grande quantidade de células inativadas após 2 min. A microscopia de fluorescência revelou que o BuTBO se localizou predominantemente no interior da levedura e o FS se acumula no interior da célula na ordem de 10^{12} moléculas por célula. Os dados sugerem que o tempo de irradiação é um fator crítico na ativação do fotossensibilizador e na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) essenciais para a inativação celular. A aPDT com BuTBO mostrou grande eficácia contra *C. albicans*, iniciando a morte do fungo após 2 min de irradiação. A combinação do fotossensibilizador com luz é crucial para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pela ação antimicrobiana. Tempos de irradiação mais longos (3 e 5 min) são determinantes para o sucesso do tratamento. O BuTBO acumula-se no fungo e gera ROS sem romper a estrutura celular o que o torna promissor no controle de infecções fúngicas.

Palavra–chave: *Candida albicans*, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, Butil Azul De Toluidina O (BuTBO).

ABSTRACT

Candida albicans is one of the most common fungal infections in humans, acting both as part of the normal microbiota and as an opportunistic pathogen. It colonizes sites such as the skin, mouth, gastrointestinal tract, and vagina. In healthy individuals, it is detected in saliva and oral mucosa in approximately 40% of cases and is associated with periodontal disease. Moreover, infection by C. albicans can trigger Th17-mediated inflammation, highlighting the need for effective and long-lasting treatments. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is a promising approach that uses photosensitizers activated by light to inhibit or kill microorganisms. This study investigated the antimicrobial effect of aPDT mediated by Toluidine Blue O Butyl (BuTBO) on C. albicans. Using the C. albicans ATCC 90028 strain, yeast cells were cultured on Sabouraud Dextrose Agar, and the efficacy of BuTBO was evaluated in comparison with control groups. The results demonstrated that irradiation without a photosensitizer was not effective against C. albicans ($p > 0.05$). From 2 minutes of irradiation onward, a reduction in microbial load was observed, with a large number of cells inactivated after 2 minutes. Fluorescence microscopy revealed that BuTBO predominantly localized inside the yeast cells, with the photosensitizer accumulating intracellularly at an order of 10^{12} molecules per cell. The data suggest that irradiation time is a critical factor for the activation of the photosensitizer and the generation of reactive oxygen species (ROS), which are essential for cellular inactivation. aPDT with BuTBO demonstrated high efficacy against C. albicans, starting the death of the fungus after 2 min of irradiation. The combination of the photosensitizer with light is crucial for ROS production, which drives the antimicrobial effect. Longer irradiation times (3 and 5 minutes) were found to be key determinants of treatment success. BuTBO accumulates within fungal cells and generates ROS without disrupting cellular structure, making it a promising candidate for controlling fungal infections.

Keywords: Candida albicans, Antimicrobial Photodynamic Therapy, Toluidine Blue Butyl O (BuTBO).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação do diagrama de Jablonski, o qual contém todos os processos que vão acontecer desde a absorção de luz até iniciar a resposta biológica ____ *17*
Figura 2 Estrutura molecular do fotossensibilizador azul de metileno (AM) ____ *18*
Figura 3 Estrutura molecular do fotossensibilizador azul de toluidina ____ *18*
Figura 4 Gráfico representado pelas setas vermelhas os picos de absorção do azul de metileno (AM) no estado de monômero (660nm) e dímero (610 nm) ____ *19*
Figura 5 Estrutura molecular do fotossensibilizador BuTBO ____ *22*
Figura 6 Absorção aquosa visível por TBO (preto) e BuTBO (traços cinzas) e PhAT (cinza médio), mostrando variação na agregação, menor comprimento de onda, ombro (concentração fotoantimicrobiana aprox. 15 μM) ____ *22*
Figura 7 Imagem ilustrativa do aumento do volume molecular assimétrico devido a 2-tert-substituição do grupo butila (BuTBO) (b) em comparação ao TBO (a) (estruturas com energia minimizada usando o software ChemDraw 3D ____ *23*
Figura 8 Resultados da Média obtida por grupo. Os dados são as médias e desvio padrão de log_{10} *(UFC/mL). Os 3 primeiros grupos são considerados controles do experimento. (* p<0,05) representa diferença estatística significante para os grupos C, L e 0; (**p,0,01) para os mesmos grupos citados anteriormente* ____ *30*
Figura 9 Tubos com leveduras submetidas ao contato com BuTBO (azul à esquerda) e Controle (branco à direita) ____ *31*
Figura 10 Média de desvio padrão de incorporação de BuTBO em leveduras. O eixo Y representa moléculas de BuTBO/célula ____ *32*
Figura 11 Imagem de C. albicans em forma de leveduras e pseudo hifas em microscopia óptica digital. Ao lado esquerdo são apresentados campos claros e à direita a sobreposição da imagem de fluorescência ____ *33*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dosimetria da fonte de luz laser que foi utilizada nos experimentos 26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AM	Azul de Metileno
ANOVA	Análise de Variância
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
ATCC	Coleção de Cultura de Tipos Americanos
BuTBO	Butil Azul de Toluidina O
C. albicans	*Candida albicans*
FS	Fotossensibilizador
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
PBS	Solução Salina Tamponada por Fosfato
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBO	Azul de Orto-Toluidina (Azul de Toluidina O)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
β-1,3-glucano	Polímero extracelular

Sumário

1. CONTEXTUALIZAÇÃO....11

1.1 CANDIDÍASE....11

1.2 *CANDIDA ALBICANS*....14

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA....16

1.4 FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZINAS....18

1.5 BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O....21

2. OBJETIVO....24

2.1 OBJETIVO GERAL....24

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS....24

3. METODOLOGIA....25

3.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO....25

3.2 IRRADIAÇÃO E PARÂMETROS....25

3.3 PREPARAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR....26

3.4. ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA MICROBIANA....26

3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA....27

3.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA E INCORPORAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR....27

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA....28

4. RESULTADOS....29

DISCUSSÃO....34

CONCLUSÃO....37

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....38

ANEXO 1 – DADOS DOS RESULTADOS DE QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA....42

ANEXO II – DADOS DE INCORPORAÇÃO DE FS....44

ANEXO III – SOBREPOSIÇÃO DE IMAGEM....45

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 CANDIDÍASE

A Candidíase Oral (CO) é uma doença infecciosa fúngica da mucosa oral causada por Candida (WEI; YAN, et al., 2020). A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida sp,* com destaque para *Candida albicans* (*C. albicans*), a espécie mais frequentemente associada a infecções em humanos. A candidíase pode se manifestar em diversas áreas do corpo, como boca, garganta, esôfago, pele e trato genital, sendo comum como superficial ou sistêmica. Esta última, embora menos comum, pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos e está associada a taxas graves de morbidade e mortalidade. *Candida spp* faz parte da microbiota comensal de diversas regiões do corpo humano, incluindo mucosa oral, intestinal e vaginal. Em condições normais, o equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro é bloqueado pelo sistema imunológico e pela microbiota bacteriana local. No entanto, diversos fatores podem alterar esse equilíbrio e propiciar o crescimento excessivo de *Candida spp*, levando à infecção. Entre os fatores predisponentes estão: uso de antibióticos de amplo espectro, imunossupressão, diabetes mellitus, gravidez e uso de contraceptivos orais. (TULASIDAS *et al*., 2018).

Nos últimos anos, com a aplicação de antibióticos de amplo espectro, glicocorticoides e imunossupressores, transplante de órgãos e tratamento de tumores, o número de pacientes com função imunológica prejudicada aumentou e a incidência de candidíase oral continuou a aumentar, tornando-se a doença infecciosa mais comum da mucosa oral (LU, 2021). Pacientes com candidíase oral são frequentemente associados a queimação, gosto amargo ou salgado desagradável, paladar alterado e, às vezes, dor e desconforto, dificuldade para engolir, náusea, vômito e diarreia. Esses sintomas podem afetar a capacidade do paciente de comer e levar a mudanças na qualidade de vida do paciente (PAPPAS *et al.,* 2009).

O principal mecanismo de virulência de *C. albicans* é sua capacidade de alternar entre formas de levedura e filamentosas, permitindo uma maior adaptação ao ambiente do hospedeiro e maior invasividade. A formação de biofilmes também desempenha um papel crucial, conferindo resistência a tratamentos antifúngicos e ao sistema imunológico do hospedeiro. *C. albicans* é um fungo dimórfico pseudofilamentar, que pode sobreviver em humanos como patógeno comensal e oportunista, podendo apresentar-se como leveduras na forma esférica ou na forma alongada, denominada "pseudo-hifa". Ambos são capazes de causar candidíase bucal,

embora sejam encontradas juntas e cada forma possa estar associada à saúde ou doença. Nos estágios iniciais da infecção, a formação de hifas pode promover a aderência e a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro. É frequentemente responsável pela gênese da candidíase invasiva (CI), que pode se manifestar de várias formas, tais como candidemia, candidíase disseminada, endocardite, meningite e candidíase oral.

A candidíase, causada principalmente pela *C. albicans*, tem se tornado uma preocupação crescente devido à sua alta prevalência, especialmente em ambientes hospitalares e entre pacientes imunocomprometidos. Dados do Ministério da Saúde indicam que, no Brasil, a taxa de candidemia nos hospitais públicos chega a 2,49 casos por 1.000 admissões hospitalares. Essa taxa é significativamente maior do que a observada em outros países, como os Estados Unidos e os da Europa (BRASIL,2024).

Estudos também destacam a relação entre a candidíase e fatores de risco específicos, como o uso de contraceptivos hormonais, condições imunológicas debilitadas e práticas de higiene. Além disso, é importante observar que as infecções por Candida podem afetar negativamente a qualidade de vida das mulheres, com impactos físicos, psicológicos e sociais, especialmente em mulheres em idade reprodutiva (SILVA *et al.,* 2024).

O sistema imunológico do hospedeiro é um fator determinante no controle da infecção. A imunidade inata, com a participação de neutrófilos e macrófagos, atua na fagocitose do fungo. Além disso, a imunidade adaptativa, mediada pelas células T, desempenha um papel importante na regulação da resposta à Candida.

Dentre as manifestações clínicas da candidíase, o local de infecção afeta um papel e curso da doença:

- Candidíase oral: Afeta principalmente neonatos, pacientes imunocomprometidos e usuários de próteses dentárias. Apresenta-se como placas brancas cremosas na mucosa oral, com sensação possível de ardência. As infecções causadas pelo gênero *Candida spp*. na cavidade bucal são definidas como candidíase bucal, que incluem quatro variações clinicamente distintas: candidíase aguda eritematosa, pseudomembranosa, eritematosa crônica e candidíase hiperplásica crônica.

- Candidíase vaginal: É comum em mulheres, com sintomas como prurido, ardência e corrimento vaginal espesso. Pode ser recorrente, especialmente em mulheres com desequilíbrio hormonal ou imunológico.
- Candidíase invasiva: ocorre principalmente em pacientes hospitalizados e imunossuprimidos, sendo uma complicação séria com potencial de disseminação sistêmica. Pode atingir o sangue (candidemia), pulmões, coração e outros órgãos.

Recentemente, a incidência da candidíase invasiva aumentou progressivamente, e essa tendência está associada a um aumento da resistência de *C. albicans* aos medicamentos antifúngicos mais comuns, como anfotericina B, nistatina, clotrimazol e fluconazol. Uma possível razão é que *C. albicans* forma comunidades microbianas ligadas à superfície, conhecidas como biofilmes, que lhes conferem uma maior resistência à ação dos antifúngicos ocasionais (TULASIDAS *et al*., 2018). De fato, as células maduras, hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* formam uma estrutura tridimensional, chamada de substância polimérica extracelular contendo β-1,3-glucano, que desempenha um papel protetor contra o sistema imunológico e medicamentos antifúngicos (GRECOA *et al*., 2020).

Biofilmes, incluindo aqueles formados por espécies do gênero *Candida spp*, representam um desafio significativo em pacientes submetidos a transplantes de órgãos. Esses biofilmes protegem os microrganismos contra as respostas imunológicas e os tratamentos antifúngicos, complicando a recuperação pós-transplante e aumentando o risco de infecções. Essas estruturas resistentes dificultam a ação de células imunológicas e medicamentos, criando uma barreira física e química ao tratamento. Esse aspecto é particularmente relevante em pacientes imunossuprimidos, como receptores de transplantes, que apresentam uma capacidade reduzida de combater infecções relacionadas a biofilmes (SEM & THUMMER, 2022; JARDOU *et al.,* 2024).

No contexto de transplantes, a formação de biofilmes tem sido associada a complicações infecciosas graves. Pesquisas destacam que alterações na microbiota, incluindo o componente fúngico, influenciam significativamente os resultados do transplante. Por exemplo, pacientes transplantados podem ser mais suscetíveis a infecções fúngicas exacerbadas pela presença de biofilmes. A imunossupressão necessária para prevenir a rejeição do enxerto também contribui para agravar o impacto dessas infecções (SEM & THUMMER, 2022).

Para mitigar os efeitos dos biofilmes nos transplantes, novas estratégias terapêuticas estão sendo investigadas. Estas incluem o uso de probióticos e o transplante de microbiota fecal, com o objetivo de restaurar o equilíbrio microbiano e reduzir o risco de infecções. Essas abordagens podem melhorar a saúde geral dos pacientes transplantados, reduzindo complicações relacionadas a infecções associadas a biofilmes (JARDOU *et al.*, 2024)

1.2 *CANDIDA ALBICANS*

Candida albicans (*C. albicans*) é um fungo, dimórfico, que faz parte da microbiota normal de várias áreas do corpo humano, como a pele, trato gastrointestinal, boca e vagina. Embora seja comensal em pessoas saudáveis, onde cerca de 40% dessa espécie pode ser detectada na saliva e na mucosa oral, *C. albicans* pode se tornar patogênica em situações de imunossupressão ou alterações da microbiota. Em condições de desequilíbrio imunológico ou devido ao uso de agentes imunossupressores, antibióticos ou estrogênios, este fungo pode causar infecções graves, que vão desde candidíase superficial a infecções sistêmicas potencialmente fatais, como a candidemia, que apresenta uma taxa de mortalidade de 35% (Christina Tsui, Eric F. Kong, Mary Ann Jabra-Rizkv et al., 2016).

Candida albicans apresenta características morfológicas marcantes:

- Dimorfismo: *C. albicans* é capaz de existir em duas formas morfológicas principais:
    - Forma de levedura: Na forma unicelular, as células são esféricas ou ovais e se reproduzem por brotamento (ou gemulação), formando colônias lisas e brancas em meios de cultura.
    - Forma filamentosa: Pode se transformar em hifas verdadeiras ou pseudohifas, que são estruturas filamentosas alongadas. Essa transição morfológica está associada à invasividade e maior capacidade de causar infecções.
- Biofilme: *C. albicans* é capaz de formar biofilmes, que são comunidades organizadas de células que se aderem a superfícies, como cateteres, próteses e tecidos mucosos. Essas estruturas conferem maior resistência à ação de antifúngicos e ao sistema imune do hospedeiro. A seguir, estão os principais fatores que dificultam o tratamento da candidíase:
    - Formação de Biofilmes: *C. albicans* é altamente eficaz na formação de biofilmes, que são comunidades de células fúngicas aderidas a superfícies biológicas ou

artificiais (como cateteres e próteses), envoltas por uma matriz extracelular protetora. Esses biofilmes são uma das principais causas de resistência aos antifúngicos.

- Resistência Intrínseca aos Antifúngicos: As células que formam biofilmes apresentam uma resistência muito maior a antifúngicos, como fluconazol e anfotericina B, em comparação às células planctônicas (não aderidas). Essa resistência ocorre devido a uma combinação de fatores, como barreiras físicas à penetração dos antifúngicos, diminuição do crescimento celular dentro do biofilme e mecanismos específicos de resistência. A resistência a antifúngicos em *C. albicans* é exacerbada pela formação de biofilmes, uma estrutura multicelular que dificulta a penetração de fármacos. No biofilme, as células se tornam menos metabolicamente ativas, o que resulta em um crescimento celular mais lento. Esse fenômeno é uma das razões pelas quais os antifúngicos são menos eficazes em ambientes biofilme, pois muitos tratamentos antimicrobianos dependem de células em crescimento rápido para serem eficazes. Além disso, as células dentro do biofilme estão mais protegidas devido à matriz extracelular e à troca de materiais que ocorre através de vesículas extracelulares, que ajudam na defesa contra as drogas (LAFLEUR et al., 2006).
- Recorrência: Infecções associadas a biofilmes são mais difíceis de erradicar, pois as células persistem em um estado adormecido e podem causar recorrência da infecção após o término do tratamento.

O aumento da resistência aos antifúngicos é uma preocupação crescente, especialmente em infecções associadas a biofilmes e em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) ou em tratamento de câncer. Em pacientes imunossuprimidos, as infecções podem progredir para formas disseminadas e sistêmicas, como a candidemia, que afeta órgãos internos como fígado, rins, pulmões e coração, sendo uma condição de difícil tratamento e alta mortalidade.

Nesse contexto, surgem novas abordagens terapêuticas, como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana que tem se mostrado uma opção promissora no tratamento de infecções fúngicas. A aPDT utiliza substâncias Fotossensibilizadoras (FS) associadas à luz visível de baixa intensidade para gerar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que causam a morte microbiana. Os fotossensibilizadores ideais penetram especificamente nas células alvo sem

afetar os tecidos normais adjacentes (KANPITTAYA *et al*., 2021). Na odontologia, LEDs azuis têm sido usados em conjunto com a aPDT para clareamento dental e como alternativa no tratamento de infecções por *Candida spp*, sendo seguros para os tecidos orais (STENDERUP, 1990).

Estudos indicam que o LED vermelho, quando combinado com corantes fenotiazínicos, como Azul de Metileno (AM), Verde Malaquita e outros, apresenta ação antifúngica eficaz contra leveduras do gênero *Candida spp*, como descrito por Costa (*et al*., 2011). A eficácia da terapia fotodinâmica é avaliada por parâmetros como as Unidades Formadoras de Colônia e ajustada conforme o pH do meio, sendo essencial garantir a homogeneidade das soluções durante o processo (MOURA, 1999). A aPDT oferece uma alternativa terapêutica promissora, especialmente em casos onde os antifúngicos tradicionais apresentam limitações devido à resistência intrínseca dos biofilmes de *Candida spp*.

Portanto, a combinação de tratamentos tradicionais com novas tecnologias, como a terapia fotodinâmica, é fundamental para o manejo eficaz das infecções fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos e em infecções recorrentes.

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) é uma técnica minimamente invasiva que combina o uso de um Fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e oxigênio molecular para combater infecções. O FS, ao ser acionado por uma luz de comprimento de onda específico, gera espécies reativas de oxigênio, como radicais livres e oxigênio singlete, que danificam membranas celulares, organelas e DNA, levando à morte celular. Esse mecanismo de ação não depende do metabolismo dos microrganismos, o que torna a aPDT eficaz contra formas resistentes de patógenos, incluindo *Candida albicans* (VIOTO *et al*., 2004; CHEVALIER *et al*., 2018; IKEH *et al*., 2017; BROWN *et al*., 2017; BROWN *et al*., 2018).

C. albicans é um fungo oportunista frequentemente associado a infecções fúngicas resistentes, como a candidíase. A aPDT tem sido considerada uma alternativa promissora para o tratamento dessas infecções, especialmente em biofilmes, que são estruturas altamente resistentes aos tratamentos convencionais (CARVALHO *et al*., 2009; PERIRA GONZALES &

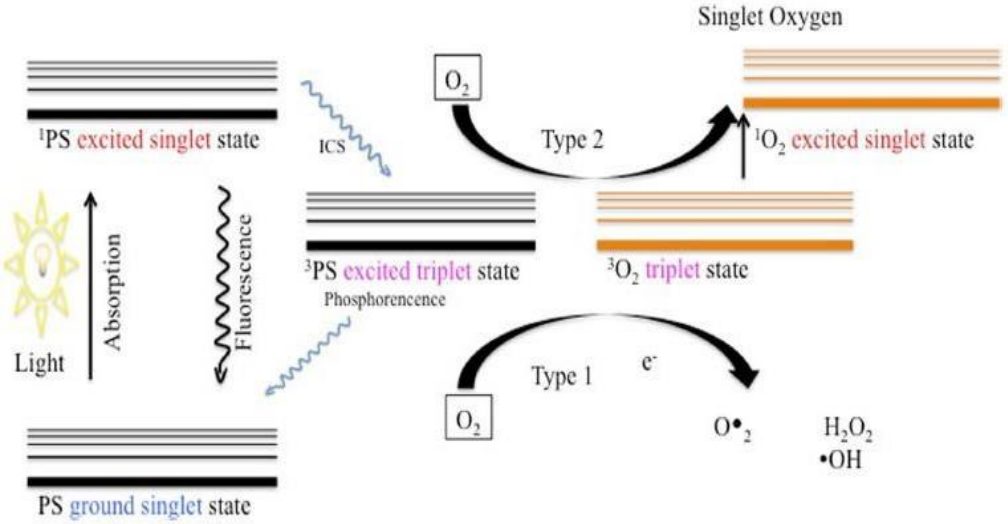
MAISCH, 2012). A aplicação do fotossensibilizador azul de metileno (AM) e o azul de orto-toluidina (TBO) apresentou eficácia limitada contra formas biofilme de *C. albicans*, devido à dificuldade de detecção desses agentes nas células fúngicas (COLLINA *et al*., 2018; AZIZI *et al*., 2016). Esse resultado pode estar relacionado aos sistemas de efluxo da membrana das células fúngicas, que visam a detecção e eficiência do fotossensibilizador.

Estudos mostram que a PDT tem sido eficaz no tratamento de candidíase oral, especialmente em pacientes imunocomprometidos e usuários de próteses dentárias, ao aplicar luz de baixa potência e fotossensibilizadores como AM, sem causar danos ao tecido saudável (PRAZAMO *et al*., 2016). Essa terapia também está sendo investigada como uma opção promissora no tratamento de candidíase vulvovaginal recorrente, uma condição difícil de tratar devido à resistência fúngica e alta taxa de recorrência (GARG *et al*., 2012; COSTA *et al*., 2011).

Além de sua aplicação em *C. albicans*, a aPDT tem sido indicada como uma abordagem terapêutica para biofilmes orais. Lasers e LEDs de diferentes comprimentos de onda têm sido amplamente utilizados em odontologia, especialmente em combinação com corantes como eritrosina e rosa bengala, para aumentar a eficácia do tratamento de infecções bacterianas e fúngicas A luz vermelha (630-700 nm) e a luz azul (380-520 nm) são comumente empregadas, dependendo do tipo de fotossensibilizador e da localização da infecção (LEE *et al*., 2012; CARRERA *et al*., 2016; MYLONA *et al*., 2020).

Embora o aPDT apresente vantagens significativas, como a baixa probabilidade de resistência por parte de *C. albicans*, há desafios, como a cobertura limitada da luz em tecidos mais espessos e a seleção do fotossensibilizador adequado para diferentes infecções (ALLAKER & DOUGLAS, 2009; METCALF *et al*., 2006). A otimização dos fotossensibilizadores e o aprimoramento da biodisponibilidade desses agentes em locais específicos são áreas importantes para o desenvolvimento da aPDT como uma ferramenta terapêutica eficaz para infecções fúngicas e bacterianas. Segue abaixo figura 1 com a Representação do diagrama de Jablonski:

Figura 1 Representação do diagrama de Jablonski, o qual contém todos os processos que vão acontecer desde a absorção de luz até iniciar a resposta biológica

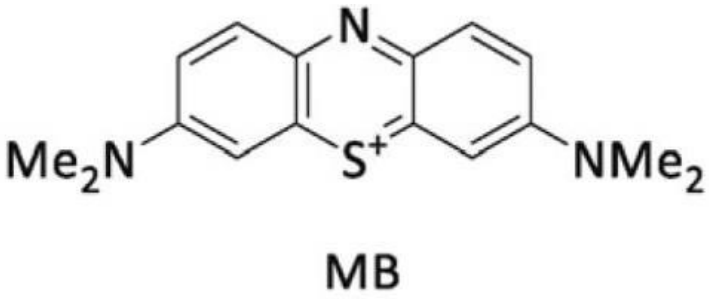


Fonte: (PERON *et.al*, 2019)

1.4 FOTOSSENSIBILIZADOR FENOTIAZINAS

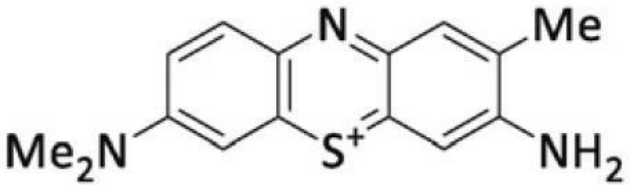
Logo abaixo nas figuras 2 e 3 temos as representações das estruturas moleculares dos dois fotossensibilizadores (FS) fenotiazinas mais conhecidos na odontologia, o AM e TBO.

Figura 2 Estrutura molecular do fotossensibilizador azul de metileno (AM)



Fonte: (WAINWRIGHT *et al*., 2016)

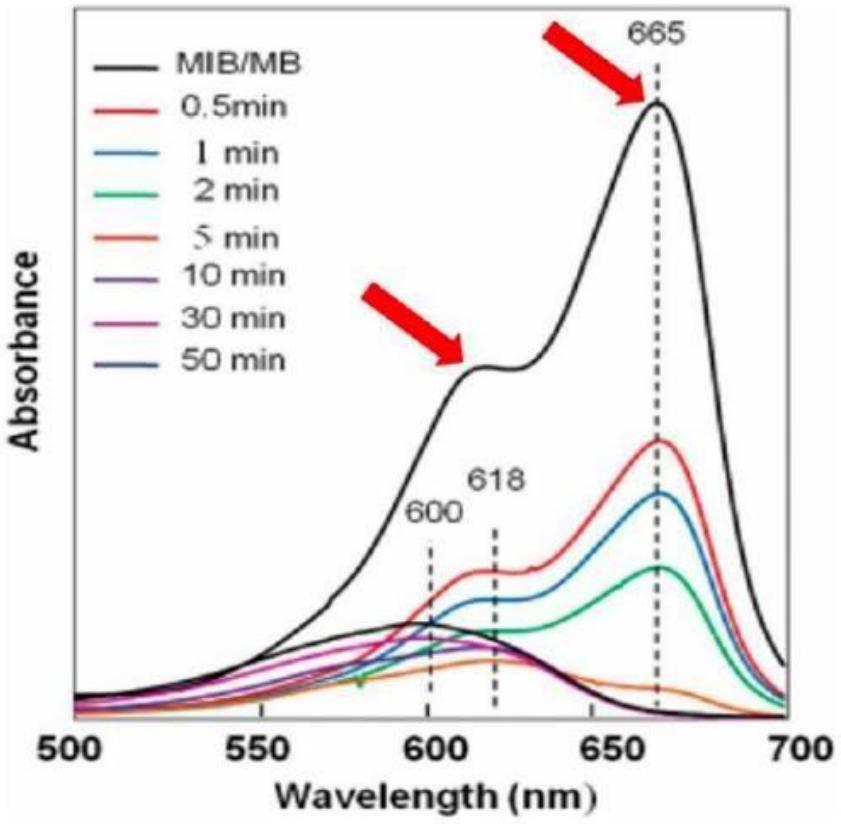
Figura 3 Estrutura molecular do fotossensibilizador azul de toluidina



TBO

Fonte: (WAINWRIGHT *et al*., 2016).

Figura 4 Gráfico representado pelas setas vermelhas os picos de absorção do azul de metileno (AM) no estado de monômero (660nm) e dímero (610 nm)



Fonte: (TAO *et al*., 2014)

Em estudos comparativos das eficácias fotoantimicrobianas do AM e TBO foram verificados pouca diferença entre eles, porém pode-se observar que o AM tem propriedades superiores em termos da variedade de desafios bacterianos, fúngicos, virais e protozoários.

Os corantes metacromáticos são capazes de controlar sua agregação ocorrendo uma mudança na sua coloração. Os mais utilizados na odontologia são os corantes básicos ou catiônicos, sendo eles os fenotiazinas. A metacromásia é um fenômeno pelo qual um corante pode absorver luz em diferentes comprimentos de onda, dependendo de sua concentração e meio ambiente. O corante, que exibe esse fenômeno sem alterar sua estrutura química, é dito ser metacromático. Quando os tecidos são corados com uma solução corante básica concentrada, as moléculas do corante ligadas são suficientemente próximas para formar agregados diméricos e poliméricos. Em uma solução diluída as fenotiazinas são monoméricos e exibem uma cor azul. Em uma solução concentrada ou hipertônica, as moléculas do corante polimerizaram e exibem a metacromásia, ocorrendo uma mudança de cor. A literatura apresenta inúmeros FS atuando de maneira eficaz na PDT. Os corantes fenotiazínicos são os mais comumente utilizados em Odontologia. FS dessa classe apresentam fototoxicidade tanto ao núcleo quando às membranas celulares. O mais conhecido deles é o AM, cuja máxima absorção ocorre em 664 nm, ou seja, a PDT com o AM deve utilizar fontes de luz emitindo fótons na faixa do vermelho visível, como os lasers vermelhos de baixa potência e os LEDs vermelhos. (HARRIS, CHATFILD, PHOENIX.,2005).

Após uma revisão de literatura sobre a utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) no tratamento periodontal, ainda há uma certa discussão entre alguns autores sobre a eficácia deste tratamento na periodontia. Nos artigos de Prates et.al, Ramos et.al e Alvarenga et.al foi constatado que a aPDT promove a morte celular de bactérias residuais e resistentes após o tratamento convencional, tendo em vista uma melhora nos parâmetros clínicos de inflamação, não apresentando sangramento à sondagem e possuindo ganho de inserção. Quanto aos parâmetros de irradiação, não existe um protocolo, apresentando divergências na literatura.

Alguns autores comprovaram que o uso do AM em uma solução de etanol ou de ureia são mais efetivos na morte microbiana do que quando são dispersos em água. Foi constatado que a utilização de outras moléculas, tais como dodecil sulfato de sódio podem controlar a agregação do AM, resultando em um aumento na quantidade de formação de monômeros e uma

diminuição de dímeros na solução, através de um aumento na interação eletrostática e hidrofóbica entre as suas moléculas. A característica hidrofílica do AM, seu baixo peso molecular e sua carga positiva permitem sua passagem através dos microrganismos, inclusive através dos canais compostos pela proteína porina nas membranas externas de bactérias gram-negativas (USACHEVA, TEICHRT, BIEL.,2003).

1.5 BUTIL AZUL DE TOLUIDINA O

O Butil Azul de Toluidina O (BuTBO) é um fotossensibilizador da família das fenotiazinas, desenvolvido a partir de modificações físico-químicas na estrutura do TBO, com substituições variáveis de hidrocarbonetos na posição cromófora 2. Essas modificações foram realizadas. por meio da rota anilinatiossulfônica, utilizando o oxidante suave carbonato de prata (II) para preservar ou substituir (WAINWRIGHT *et al*., 2016). A estrutura molecular do BuTBO apresenta mudanças significativas em comparação ao TBO, como o aumento do comprimento de onda de observação visível e a diminuição da agregação molecular, especialmente em compostos com substitutos volumosos (SILVA *et al*., 2011).

Essas modificações físico-químicas resultaram em propriedades fotodinâmicas aprimoradas, como o aumento na produção de oxigênio singleto, que desempenha um papel crucial na aPDT. O BuTBO tem mostrado ser eficaz em tratamentos periodontais, reforçado a renovação e melhorando os componentes do tecido conjuntivo em comparação ao TBO e ao azul de metileno (AM) (FREIRE *et al*., 2014). Além disso, estudos in vitro e in vivo indicam que o BuTBO melhorou o controle da perda óssea no tratamento de periodontite experimental (GANNUM *et al*., 2010).

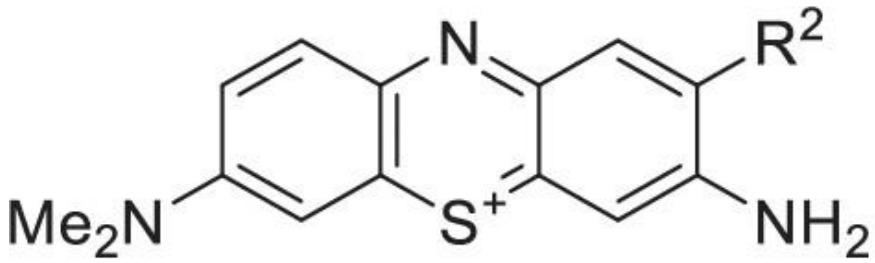
O BuTBO, sendo uma forma modificada do TBO, é conhecido por sua capacidade de se ligar a ácidos nucleicos e polissacarídeos, facilitando a coloração intensa de estruturas microscópicas em antropométricas histológicas, o que o torna amplamente utilizado em laboratórios de biologia e medicina (WAINWRIGHT *et al*., 2016). Essa química é especialmente útil em colorações metacromáticas, onde o corante pode mudar de cor dependendo do pH e da composição do tecido (SILVA *et al*., 2011). Em diagnósticos, o BuTBO tem aplicação em estudos de biofilmes microbianos, facilitando a visualização e quantificação de biofilmes em diferentes superfícies (GANNUM *et al*., 2010).

Entre suas aplicações específicas, o BuTBO tem destaque na terapia fotodinâmica, onde sua ativação por luz visível resulta na geração de espécies reativas de oxigênio que induzem a morte celular. Essa abordagem tem eficácia indicada no tratamento de infecções microbianas (FREIRE *et al*., 2014). Na odontologia, o BuTBO é utilizado na aPDT para combater biofilmes e infecções orais (SILVA *et al*., 2011).

A relevância do BuTBO no combate à *C. albicans* é notável. Esta levedura, responsável por infecções graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, forma biofilmes altamente resistentes aos tratamentos antifúngicos convencionais. O BuTBO, ativado por luz visível, gera ROS, mostrando ser uma ferramenta poderosa no tratamento de infecções fúngicas resistentes (GANNUM *et al*., 2010).

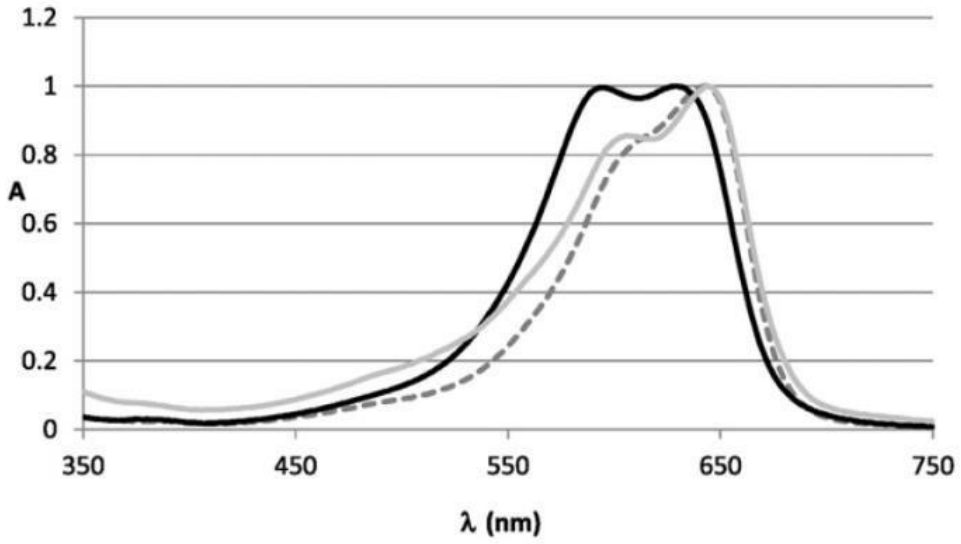
Portanto, o BuTBO é uma variante promissora do azul de toluidina, com aplicações amplas e versáteis em biologia, medicina e odontologia, oferecendo uma abordagem eficaz para o tratamento de infecções fúngicas e microbianas (WAINWRIGHT et al., 2016; SILVA *et al*., 2011).

Figura 5 Estrutura molecular do fotossensibilizador BuTBO



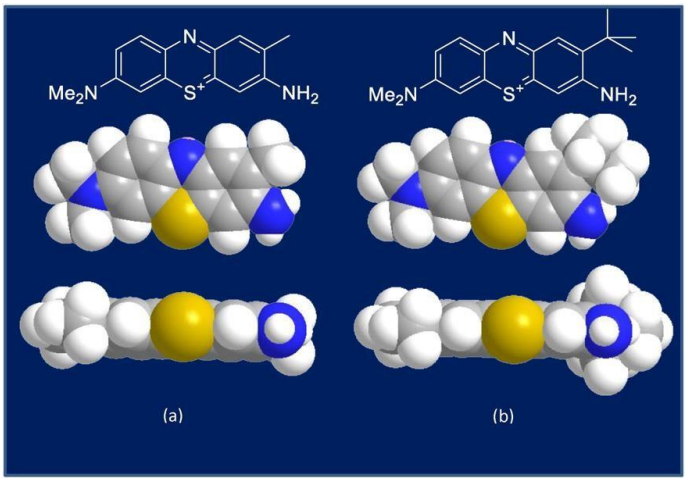
Fonte: (WAINWRIGHT *et al*., 2016).

Figura 6 Absorção aquosa visível por TBO (preto) e BuTBO (traços cinzas) e PhAT (cinza médio), mostrando variação na agregação, menor comprimento de onda, ombro (concentração fotoantimicrobiana aprox. 15 μM)



Fonte: (WAINWRIGHT *et al*.,2016).

Figura 7 Imagem ilustrativa do aumento do volume molecular assimétrico devido a 2-tert-substituição do grupo butila (BuTBO) (b) em comparação ao TBO (a) (estruturas com energia minimizada usando o software ChemDraw 3D



Fonte: (WAINWRIGHT *et al*.,2016).

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a eficácia antimicrobiana do fotossensibilizador BuTBO na inativação de *C. albicans*, considerando fatores associados à sua interação com as células fúngicas e os parâmetros de irradiação com luz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar a aPDT com BuTBO na inativação de *C. albicans*, considerando diferentes tempos de irradiação com luz;
- Caracterizar a interação e acúmulo de FS em *C. albicans*, avaliando os níveis de incorporação do fotossensibilizador;
- Rastrear a localização intracelular do BuTBO em *C. albicans*, utilizando métodos específicos de imagem.

3. METODOLOGIA

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

3.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Subsequente ao descongelamento e crescimento em ágar Sabouraud, duas colônias foram isoladas e colocadas para crescimento em caldo Sabouraud por 24h em atmosfera aeróbica a 37 ºC em tubos propileno de 15 mL. Após esse período, o tubo foi centrifugado a 4000 x g e as células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada por fosfato com pH ajustado em 7,2. O inóculo foi preparado com a suspensão em 7 mL de solução salina tamponada por fosfato do *pellet* de *C. albicans* formado no tubo de propileno, com transmitância correspondente à escada 1 de McFarland, que corresponde a aproximadamente uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

3.2 IRRADIAÇÃO E PARÂMETROS

A fonte de luz utilizada para a excitação do fotossensibilizador foi um laser de diodo (Photon Lase III, DMC, São Carlos, Brasil) com os parâmetros citados no quadro a seguir (tab.1).

As amostras foram irradiadas de cima para baixo em uma placa de titulação de 96 poços e alíquotas foram colhidas nos tempos de leitura (Figura 3). Cada poço foi irradiado individualmente em placa de 96 poços. A área de cultura do poço é de 0,4 cm2 e os parâmetros de irradiação são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dosimetria da fonte de luz laser que foi utilizada nos experimentos.

Parâmetros de irradiação	Laser
Comprimento de onda (nm)	660 ± 2
Modo de operação	Continuo
Potência radiante (mW)	100
Área do feixe (cm^2)	0,4
Diâmetro do feixe (cm)	0,714
Irradiância (mW/ cm^2)	250
Tempo de exposição (min)	1, 2, 3, 5
Tempo de pré-irradiação (s)	60
Exposição radiante (J/cm^2)	15, 45, 60, 75
Energia radiante (J)	6,12, 18, 30

Fonte: Autoria própria.

3.3 PREPARAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

Foi utilizado como fotossensibilizador o corante butil azul de toluidina O (BuTBO) na concentração final de 100 µM. Preparado em uma solução mãe na concentração de 10.000 µM, pela diluição do pó em água deionizada. Posteriormente esta foi filtrada por uma membrana estéril 0,22 µm (Milipore, SP, Brasil) e armazenado em microtubos protegido da luz. Para o experimento, foi utilizado um tubo plástico (microtubos) e preparado 1 mL de solução salina tamponada por fosfato com 10 µL de (BuTBO), na concentração final de 100 µM.

3.4. ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA MICROBIANA

Para o ensaio microbiológico, onde foi verificado a fotoinativação do fungo, as suspensões de leveduras foram divididas nos seguintes grupos: Controle sem irradiação ou fotossensibilizador (C), grupo irradiado sem fotossensibilizador (L), grupo fotossensibilizador sem irradiação (O), e os grupos que receberam fotossensibilizador e irradiação chamados grupos Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) são descritos pelo valor de tempo de irradiação em minutos (1, 2, 3 e 5 min). Por exemplo: o grupo aPDT que recebeu irradiação por

2 min será chamado (2). O experimento foi realizado em triplicata e com pelo menos 3 repetições.

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

3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Amostras de *C. albicans* foram crescidas em caldo Sabouraud por 48 h e depois lavadas 3 vezes em solução salina tamponada por fosfato 7.2 para remoção do excesso de meio de cultura. Posteriormente, elas foram divididas em 2 grupos: 1) grupo controle sem fotossensibilizador; e 2) grupo BuTBO, que ficou em contato com 100 μM de BuTBO durante 1 min. As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido com pipeta e, então, as células foram novamente lavadas 3 vezes para remoção do excesso de fotossensibilizador. Os fungos foram suspensos em glicerol 40% para dificultar o bombeamento e saída de fotossensibilizador da célula, então amostras de 50 μL foram colocadas em placas de 96 poços, de fundo chato e levados para observação no microscópio de fluorescência (ZOE *fluorescente cell imager*). A imagem de fluorescência foi obtida com excitação em verde e leitura na faixa do vermelho do espectro eletromagnético. Para análise, 6 campos foram observados e fotografados.

3.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA E INCORPORAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR

Para mensuração do Fotossensibilizador (FS) no interior de *C. albicans*, as células fúngicas foram crescidas em caldo Sabouraud por 48 h, depois foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada por fosfato como escrito na sessão anterior. As células foram coradas com BuTBO por 1 min e depois lavadas novamente. O *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de 0,1M NaOH e 1% Dudecil sulfato de sódio (SDS) por 48 horas. Após esse período, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante retirado para análise. Alíquotas de 100 μL foram colocadas em uma placa de 96 poços de fundo chato e sua absorção ótica foi medida no espectrofotômetro (Epoch, Biotek, Santa Clara, USA). Também foi avaliada a solução de BuTBO a 100 μM sem contato prévio com células fúngicas. Nesta oportunidade, realizou-se a leitura do espectro de absorção do BuTBO na faixa de 350 a 700 nm, com intervalo de leitura

de 1 nm. Esse espectro foi um teste para observar possíveis alterações da absorção do FS depois de ter estado em contato com *C. albicans*.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise microbiológica foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônias e convertida em Log^{10} (UFC/mL). Os dados foram submetidos à análise de normalidade Kolmogorov Smirnov e considerados com padrão de distribuição normal. Foi adotada a apresentação de média e desvio padrão e todos os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de variância one-way (ANOVA). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey e significância de 5%, sendo considerados estatisticamente diferentes quando $p<0,05$.

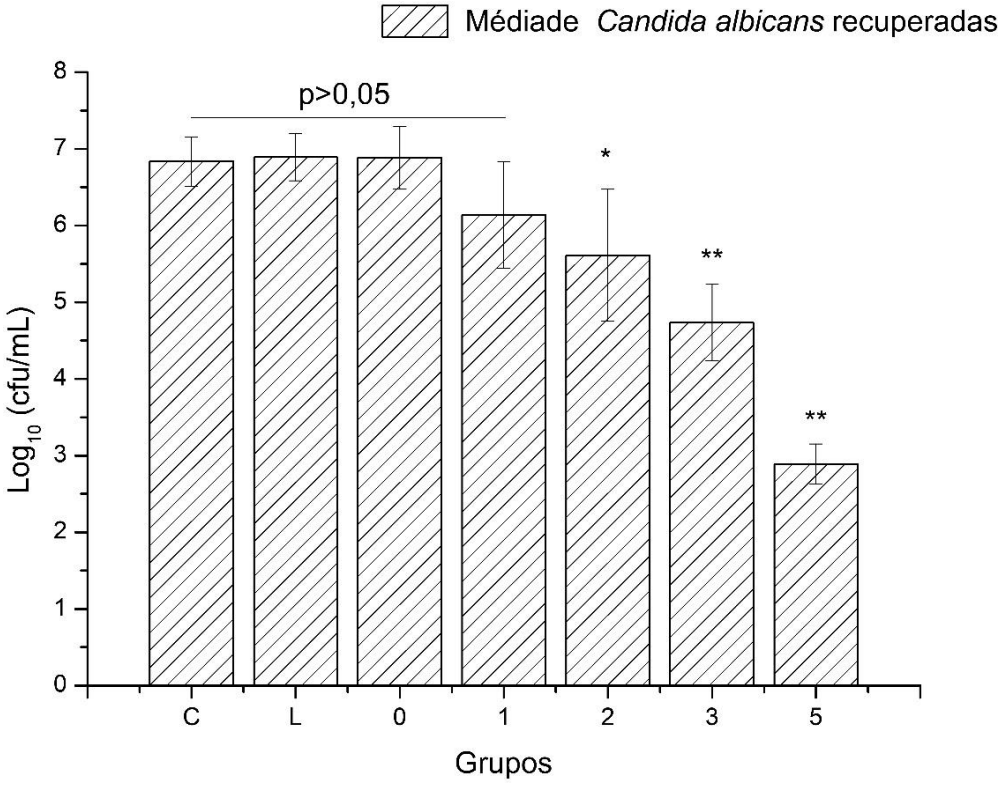
Os dados de incorporação de FS foram testados para normalidade com Kolmogorov Smirnov e considerados com padrão de distribuição normal. Foi adotada a apresentação de média e desvio padrão e todos os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste-T para par de médias.

4. RESULTADOS

Este estudo avaliou a eficácia do fotossensibilizador BuTBO na aPDT por meio da comparação dos dados de cada grupo com o grupo controle, que não recebeu tratamento. Os dados foram expressos com médias do log_{10} de UFC/mL. No gráfico, o número de células sobreviventes é representado em Log_{10} (UFC/mL). No grupo controle, no grupo laser e no grupo "0" (fotossensibilizador sem irradiação), não houve alterações significativas na quantidade de células ($p>0,05$), ou seja, esses grupos foram estatisticamente iguais. O grupo irradiado por 5 min sem fotossensibilizador (grupo L) registrou uma média de 6,89±0,30 log_{10} (UFC/mL), semelhante ao grupo "0".

Após 1 minuto de irradiação, não foi observada uma redução microbiana significativa em comparação com os grupos C, L e 0, refletindo a falta de alteração na quantidade de UFC/mL ($p>0,05$). Contudo, a partir de 2 minutos de irradiação, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo laser ($p<0,05$), com uma redução na quantidade de células. Essa diminuição do número de leveduras viáveis foi mais pronunciada com tempos de irradiação mais longos, como 3 e 5 minutos, sendo que no tempo de 5 minutos a redução foi superior a 99%. A redução microbiana foi significativamente diferente do grupo C, L, 0, 1 ($p<0,01$), demonstrando que a eficácia do fotossensibilizador aumentou com o tempo de irradiação.

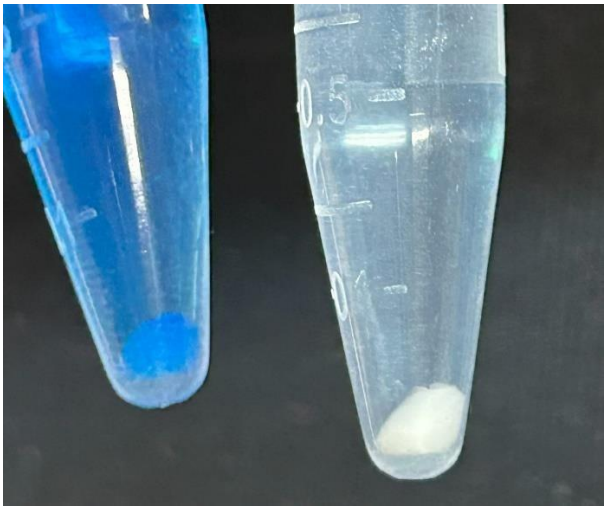
Figura 8 Resultados da Média obtida por grupo. Os dados são as médias e desvio padrão de log_{10} (UFC/mL). Os 3 primeiros grupos são considerados controles do experimento. (* p<0,05) representa diferença estatística significante para os grupos C, L e 0; (**p,0,01) para os mesmos grupos citados anteriormente



Fonte: Os autores

A incorporação de FS pelas células de fungos foi avaliada e observamos que o fungo absorve o BuTBO da suspensão e consegue acumular em seu interior. Após 1 min de contato, podemos observar que o *pelet* de leveduras se encontra totalmente corado em azul (Figura 9). Este é um forte indício de que o FS está se acumulando diretamente no material biológico e que podemos inferir que as moléculas do BuTBO têm afinidade por *C. albicans.*

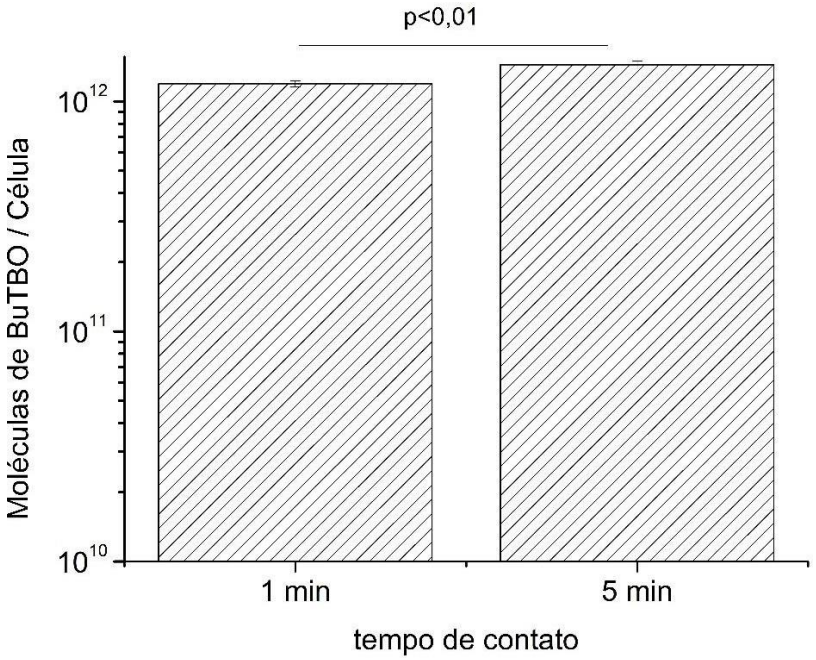
Figura 9 Tubos com leveduras submetidas ao contato com BuTBO (azul à esquerda) e Controle (branco à direita)



Fonte: Os autores

Como aprimoramento da análise de incorporação de FS pelas leveduras, a absorbância das células foi avaliada em espectrofotômetro. A análise de incorporação demonstrou que as células fúngicas absorvem o BuTBO em uma ordem de aproximadamente 10^{12} moléculas por célula. Um tempo de contato superior (5 min) apresentou a mesma ordem de grandeza em moléculas por célula, porém com diferença estatística ($p<0,05$) quando comparado aos grupos expostos por 1 min (Figura 10). Essa diferença apesar de estatisticamente significante, não apresentou diferenças em efetividade da aPDT nos nossos dados em experimentos piloto, onde usamos 5 min de incubação antes da irradiação das células. Esses danos não são apresentados nesse documento porque são iguais aos dados da (Figura 10).

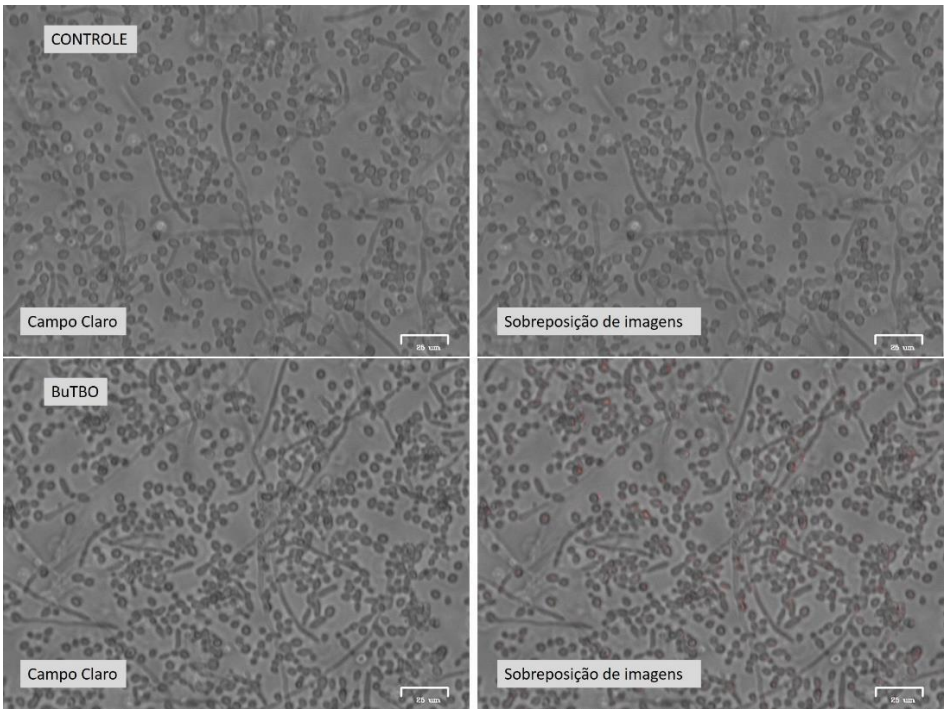
Figura 10 Média de desvio padrão de incorporação de BuTBO em leveduras. O eixo Y representa moléculas de BuTBO/célula



Fonte: Os autores

A Figura 11 abaixo mostra 4 imagens comparativas entre grupo controle (C) (fotos superiores) e o grupo corado com FS BuTBO (0) (fotos inferiores). As imagens representam o campo claro de microscopia óptica (esquerda) e a sobreposição com imagem de fluorescência (direita). Podemos observar que no grupo C a sobreposição demonstrou ausência de fluorescência e as imagens são idênticas. Já para o grupo 0, podemos identificar pontos de fluorescência (vermelha) sobrepondo-se aos corpos celulares. É importante ressaltar que apenas as leveduras expostas ao FS apresentaram imagem de fluorescência. Uma figura com contaste maior permite ver em detalhes o acúmulo de FS no interior do fungo (ANEXO III – SOBREPOSIÇÃO DE IMAGEM).

Figura 11 Imagem de *C. albicans* em forma de leveduras e pseudo hifas em microscopia óptica digital. Ao lado esquerdo são apresentados campos claros e à direita a sobreposição da imagem de fluorescência



Fonte: Os autores

DISCUSSÃO

A análise dos dados obtidos neste estudo revela informações cruciais sobre a eficácia da aPDT no combate a *C. albicans*, com destaque para as limitações e o potencial dessa abordagem terapêutica. Diferentes grupos experimentais, com ou sem o uso de fotossensibilizador e tempos variados de irradiação contribuíram para a compreensão da interação entre o fotossensibilizador BuTBO, a luz e as células de *C. albicans*.

Os resultados demonstram que, em grupos irradiados por luz sem o fotossensibilizador (L), houve um nível elevado de sobrevivência celular (6,5 $\log_{10}$ UFC/mL). Isso confirma que a luz, isoladamente, não é capaz de causar um efeito citotóxico significativo, concordando com estudos prévios que indicam a necessidade de um fotossensibilizador para gerar ROS eficazes (CHEVALIER *et al*., 2018; VIOTO *et al*., 2004). Da mesma forma, o grupo tratado apenas com o BuTBO, sem irradiação (0), apresentou resultados semelhantes (6,28 $\log_{10}$ UFC/mL), reforçando que o BuTBO não é tóxico por si só nas condições experimentais.

A ausência de redução significativa na viabilidade celular no grupo irradiado por 1 min sugere que o tempo de irradiação é crucial para a ativação completa do fotossensibilizador e a geração eficaz de ROS, algo previamente reportado por BROWN *et al*. (2017) e CARVALHO *et al*. (2009). A partir de 30 segundos, observou-se uma redução na população microbiana, que aumentou significativamente com 60 e 90 segundos de irradiação, levando a uma redução de 1 $\log_{10}$ UFC/mL. Esse dado corrobora a ideia de que o tempo de exposição à luz é um fator determinante na eficácia da aPDT (GARG *et al*., 2012).

A erradicação de células de *C. albicans* após 2 min de irradiação, aliada ao uso de BuTBO, destaca o potencial da aPDT como uma abordagem terapêutica promissora, especialmente considerando a resistência crescente de *C. albicans* aos antifúngicos convencionais, como fluconazol. A capacidade do BuTBO de gerar ROS com uma dose adequada de luz reforça sua utilidade no tratamento de infecções fúngicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos e em infecções causadas por biofilmes (TULASIDAS *et al*., 2018).

A análise microscópica das células coradas com BuTBO revelou que a fluorescência observada no interior celular, sem coloração nuclear, sugere uma afinidade preferencial pelo citoplasma fúngico, o que pode estar relacionado à composição da membrana nuclear. Essa distribuição pode ser relevante para a eficácia do tratamento, considerando que a geração de ROS ocorre majoritariamente nas regiões onde o fotossensibilizador está presente (COLLINA *et al*., 2018).

Esses achados reforçam o potencial da aPDT no controle de infecções fúngicas resistentes, especialmente *C. albicans*. No entanto, a eficácia depende de fatores como a concentração do fotossensibilizador, o tempo e a intensidade da irradiação, como sugerido por estudos anteriores (AZIZI *et al*., 2016). Pesquisas futuras poderiam explorar novos fotossensibilizadores e fontes de luz para otimizar os resultados terapêuticos contra patógenos resistentes.

Embora os resultados deste estudo tenham demonstrado a eficácia do BuTBO combinado à luz na inativação de *C. albicans*, é essencial avaliar o impacto do fotossensibilizador em células saudáveis para garantir sua segurança no uso clínico. Em nossas condições experimentais, o BuTBO não apresentou toxicidade significativa quando aplicado isoladamente, como evidenciado pelo grupo (0), onde a sobrevivência celular foi elevada (6,28 $\log_{10}$ UFC/mL). Esse achado sugere que o fotossensibilizador, na ausência de ativação por luz, é inócuo para *C. albicans*.

No entanto, é necessário considerar que, uma vez ativado, o BuTBO pode gerar ROS capazes de danificar estruturas celulares, independentemente de serem células fúngicas ou hospedeiras. Estudos prévios (Collina *et al*., 2018 e Azizi *et al*., 2016) ressaltam que a toxicidade da terapia fotodinâmica depende da seletividade do fotossensibilizador pelas células-alvo. Nas análises microscópicas realizadas neste estudo, a fluorescência observada no citoplasma fúngico sugere uma camada específica pelo citoplasma de *C. albicans*, o que pode minimizar o risco de danos às células saudáveis, desde que o fotossensibilizador seja corretamente dosado e direcionado.

A aPDT mediada por BuTBO tem efeito fungicida, conforme demonstrado pelos resultados do estudo. A aPDT com BuTBO e luz foi eficaz na redução da população de *C. albicans*, iniciando a morte do fungo após 2 min de irradiação. Esse efeito fungicida é devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos irreversíveis às células

fúngicas, resultando na morte celular. O estudo indica que o BuTBO, quando ativado pela luz, gera ROS de maneira eficaz.

Não foi observada resistência bacteriana no estudo. O estudo não investiga a ocorrência de resistência ao tratamento, mas destacou a importância da aPDT como uma alternativa promissora, diante da resistência crescente de *C. albicans* a antifúngicos eficientes, como o fluconazol. A capacidade do BuTBO de gerar ROS de forma eficaz sugere que a resistência ao tratamento com aPDT não foi um fator limitante neste estudo (COLLINA *et al.*, 2018).

As perspectivas para o uso da aPDT com BuTBO no tratamento de infecções fúngicas, especialmente causadas por *C. albicans*, são promissoras, principalmente devido à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) de forma eficaz e à seletividade do fotossensibilizador pelo citoplasma fúngico. Essa abordagem terapêutica poderia oferecer uma alternativa para o tratamento de infecções resistentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou em casos de infecções por biofilmes. No entanto, há limitações que precisam ser abordadas em pesquisas futuras. Um aspecto a ser explorado é a otimização das condições de aplicação da aPDT, como a dosagem ideal do fotossensibilizador e os tempos e intensidades de irradiação, para maximizar a eficácia. Além disso, a segurança do BuTBO em tecidos humanos deve ser aprofundada, avaliando possíveis efeitos adversos a longo prazo, particularmente em tratamentos clínicos. Estudos futuros também poderão investigar novos fotossensibilizadores e fontes de luz para melhorar ainda mais os resultados terapêuticos, além de realizar testes em modelos mais complexos, como animais, para avaliar a eficácia e segurança do tratamento em um cenário mais próximo do clínico.

CONCLUSÃO

A aPDT com BuTBO mostrou eficácia significativa na redução da viabilidade microbiana de *C. albicans*. A combinação do fotossensibilizador com a luz foi essencial para a geração de ROS, alcançando reduções microbianas expressivas após 2 min de exposição. Esses achados reforçam a aplicabilidade terapêutica do BuTBO no controle de infecções fúngicas resistentes.

O tempo de irradiação foi determinante para a eficácia antimicrobiana. Enquanto exposições curtas não foram suficientes para causar redução significativa na viabilidade microbiana, tempos mais longos (3 e 5 min) resultaram em reduções progressivas e estatisticamente significativas, evidenciando a importância de parâmetros bem definidos para maximizar o efeito da aPDT.

As análises microscópicas revelaram que o BuTBO foi incorporado no fungo. Esse padrão de distribuição sugere que o fotossensibilizador interage com a parede celular e o citoplasma, locais cruciais para a geração de ROS e inativação microbiana.

A fluorescência observada no citoplasma indica uma afinidade preferencial do BuTBO por essa região celular, potencializando sua ação terapêutica. Essa localização intracelular estratégica pode explicar a alta eficácia da aPDT e minimiza riscos de danos colaterais, desde que o tratamento seja bem direcionado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. Postgrad Med J, v. 78, p. 455-459, 2002.

AZIZI, A.; AMIRZADEH, Z.; REZAI, M.; LAWAF, S.; RAHIMI, A. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 158, p. 267–273, 2016.

BRAZIL. Ministry of Health Epidemiological situation. Available at: https://www.saude.gov.br. Accessed on: November 18, 2024.

BRAZIL. Ministry of Health. Epidemiological Situation. Available at: https://www.saude.gov.br. Accessed on: November 18, 2024.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. *et al*. Hidden killers: human fungal infections. Science Translational Medicine, v. 4, n. 165, p. 165, 2012.

CARRERA, E. T.; DIAS, H. B.; CORBI, S. C. T.; MARCANTONIO, R. A. C.; BERNARDI, A. C. A.; BAGNATO, V. S.; HAMBLIN, M. R.; RASTELLI, A. N. S. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. Laser Physics, v. 26, n. 12, p. 123, 2016.

CARVALHO, G. G.; FELIPE, M. P.; COSTA, M. S. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. Journal of Microbiology, v. 47, n. 5, p. 619–623, 2009.

CHEVALIER, M.; RANQUE, S.; PRÊCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. Medical Mycology, v. 56, n. 6, p. 653–667, 2018.

CHOI, S. J.; PARK, H. W.; LEE, J. H.; SEO, H. W.; LEE, S. Y. Optimum treatment parameters for photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* biofilms. Journal of the Korean Academy of Pediatric Dentistry, v. 42, p. 151–157, 2015.

CINZIA, C.; FANULI, M.; VIGANÒ, L. Photodynamic therapy for oral candidosis: a new option? Juniper Online J Case Stud, v. 6, n. 5, p. 1-3, 2018. https://doi.org/10.19080/JOJCS.2018.06.555698.

COLLINA, G. A.; FREIRE, F.; SANTOS, T. et al. Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using photodynamic therapy. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 17, n. 10, p. 1355–1364, 2018.

COSTA, A. C. B. P.; RASTEIRO, V. M. C.; PEREIRA, C. A.; ROSSONI, R. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. Mycoses, v. 55, n. 1, p. 56–63, 2011.

COSTA, A. L. C. Effects of photodynamic therapy mediated by rose bengal and erythrosine in *Candida albicans*. São José dos Campos Dental School, UNESP, 2011.

FREIRE, F.; LIMA, E.; MARTINS, D. C. Photodynamic therapy: antimicrobial and antitumoral properties. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2014, v. 106, p. 17-28.

FREIRE, S. M. A. Comparison of the effect of photodynamic inactivation mediated by rose bengal and eosin Y in planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. Lasers in Medical Science, 2014, v. 29, p. 949–955.

GHANNOUM, M.; JUREVIC, R.; MUKHERJEE, P.; CUI, F.; SIKAROODI, M.; NAQVI, A.; GILLEVET, P. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog, v. 1, p. e1000713, 2010.

GANNUM, M. et al. The use of a microplate coculture assay to evaluate the antifungal activity of selected dental materials. Journal of Dentistry, 2010, v. 38, no. 12, p. 916-922.

GARG, A. D.; BOSE, M.; AHMED, M. I.; BONASS, W. A.; WOOD, S. R. In vitro studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells. PLoS One, v. 7, n. 4, p. e34475, 2012.

GOLDMAN, G. H.; DA SILVA FERREIRA, M. E.; DOS REIS MARQUES, E. et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis, v. 50, p. 25-32, 2004. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.04.009.

GONG, J.; PARK, H.; LEE, J.; SEO, H.; LEE, S. Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*. Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery, v. 37, n. 5, p. 282-287, 2019.

GRECOA, G.; DI PIAZAA, S.; CHANB, J.; ZOTTIA, M.; HANNA, R.; GHENO, et al. Newly formulated 5% 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on *Candida albicans*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 29, p. 101575, 2020.

GRECOA, L. et al. Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on various surfaces. J Fungi (Basel), v. 6, n. 4, p. 137, 2020. https://doi.org/10.3390/jof6040137.

HARRIS, F.; PHOENIX, DA Fotossensibilizadores baseados em fenotiazínio – agentes fotodinâmicos com multiplicidade de alvos celulares e aplicações clínicas. Current Drug Targets , v. 6, n. 5, p. 615-627, 2005.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 39, n. 9, p. 2128–2131, 1995.

IKEH, M.; AHMED, Y.; QUINN, J. Phosphate acquisition and virulence in human fungal pathogens. Microorganisms, v. 5, n. 3, p. 48, 2017.

JARDOU, M.; BROSSIER, C.; MARQUET, P.; PICARD, N.; DRUILHE, A.; LAWSON, R. Solid organ transplantation and gut microbiota: a review of the potential immunomodulatory properties of short-chain fatty acids in graft maintenance.

KANPITTAYA, TEERAKAPONG; MORALES et al. Inhibitory effects of photodynamic therapy mediated by erythrosine/curcumin/nanotitanium dioxide derivatives in *Candida albicans*. Molecules, 2021.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINZ-VACCMI, E. M. et al. Guide for identification of fungi - actinomycetes - algae of medical interest. 1998. 433 pages.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. CA Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells.Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 3234-3238, 2006. DOI: https://doi.org/10.1128/aac.00684-06.

LEE, H.; PARK, H. W.; LEE, J. H.; SEO, H. W.; LEE, S. Y. The photodynamic therapy on Streptococcus mutans biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. International Journal of Oral Science, v. 4, n. 4, p. 196, 2012.

LU, S. Y. Oral Candidosis: pathophysiology and best practice for diagnosis, classification, and successful management. J Fungi (Basel), v. 7, n. 7, p. 555, 2021. https://doi.org/10.3390/jof7070555.

METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; WOOD, S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 58, p. 190–192, 2006.

MOURA, RA Técnicas de laboratório. 3.ed. São Paulo: Ateneu, 1999. 511 p.

MYLONA, V.; ANAGNOSTAKI, E.; PARKER, S.; CRONSHAW, M.; LYNCH, E.; GROOTVELD, M. Laser-assisted aPDT protocols in randomized controlled clinical trials in dentistry: a systematic review. Dentistry Journal (Basel), v. 8, n. 3, p. 107, 2020.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, v. 48, p. 503-535, 2009. https://doi.org/10.1086/596757.

PEREIRA GONZALES, F.; MAISCH, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. Fungal Biology, v. 116, p. 1, 2012.

PRAZAMO, E. J.; KWAŚNY, M.; ŁAPIŃSKI, M.; MIELCZAREK, A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. Advances in Clinical and Experimental Medicine, v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016.

SEN, T.; THUMMER, R. P. The impact of human microbiota on hematopoietic stem cell and organ transplantation. Frontiers in Immunology, v. 13, 2022. Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.932228. Accessed on: November 17, 2024.

SILVA, J. H. D.; SÁ, J. C. D.; SALES, G. C. B.; GOMES, K. L. Bibliographic review on the prevalence of *Candida sp*. in women of reproductive age: risk factors and health impacts. Health Sciences, Collective Health, v. 28, ed. 137, Aug. 2024. Published on: August 31, 2024.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-*Candida albicans* species: quantification, structure, and matrix composition. Medical Mycology, 2011, v. 49, no. 8, p. 802-809.

STENDERUP, A. Oral mycology. Acta Odontologica Scandinavica, Oslo, v. 1, p. 3-10, 1990.

TULASIDAS, S. et al. The impact of biofilm formation on *Candida albicans* pathogenicity and antifungal resistance. J Mycol, v. 9, p. 18-27, 2018. https://doi.org/10.4081/jmyco.2018.7406.

TULASIDAS, S.; RAO, P.; BHAT, S.; MANIPURA, R. A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida species* from vulvovaginal and bloodstream infections. Infectious Diseases and Therapy, v. 11, p. 2443–2448, 2018.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazinium dyes. Lasers in Surgery and Medicine, v. 33, no. 5, p. 311-319, 2003.

WAINWRIGHT, M.; RAWTHORE, S. Phenothiazinium photosensitizers XI. Enhanced toluidine blue antimicrobial photoagents. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 160, p. 68–71, 2016.

WEI, S.; YAN, Z. Clinical characteristics of oral candidiasis: a retrospective analysis of 356 cases. Front Med (Lausanne), v. 7, p. 220, 2020. https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00220.

ANEXO 1 – Dados dos resultados de quantificação microbiana

Apresentamos os dados brutos das médias de cada experimento de quantificação microbiana. Cada coluna representa o resultado médio de 3 contagens com posterior ajuste e transformação em UFC/mL. Em cada experimento foi gerado no mínimo 3 linhas de contagem e a média dessas contagens podem ser observadas para cada grupo experimental. Na parte inferior da tabela, são apresentados os dados de Log_{10} das ufc/mL.

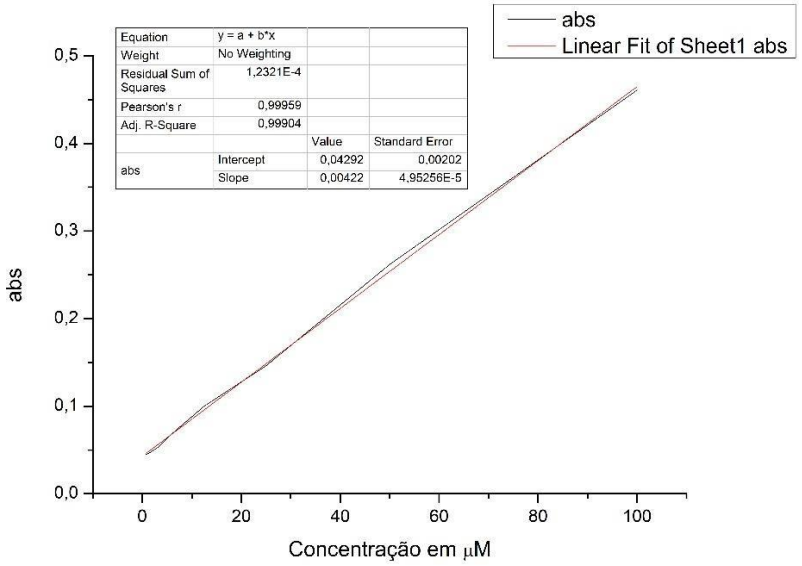
ufc/mL	04/05/2023	18/04/2023	29/05/2023	06/03/2024	13/03/2024
C	5,00E+06	2,25E+07	3,50E+06	8,50E+06	4,50E+06
L	7,50E+06	1,45E+07	2,50E+06	8,00E+06	1,30E+07
0	3,50E+06	2,05E+07	3,00E+06	6,00E+06	2,10E+07
1	1,25E+05	1,15E+07	1,50E+06	1,50E+06	1,50E+06
2	1,80E+04	3,45E+06	4,95E+05	3,00E+05	1,25E+06
3	1,00E+04	7,45E+04	2,50E+05	5,00E+04	5,00E+04
5	5,00E+02	5,00E+02	1,50E+03	5,00E+02	1,50E+03
Log (ufc/mL)					
C	6,70	7,35	6,54	6,93	6,65
L	6,88	7,16	6,40	6,90	7,11
0	6,54	7,31	6,48	6,78	7,32
1	5,10	7,06	6,18	6,18	6,18
2	4,26	6,54	5,69	5,48	6,10
3	4,00	4,87	5,40	4,70	4,70
5	2,70	2,70	3,18	2,70	3,18

A tabela abaixo mostra as comparações estatísticas das médias entre os grupos.

Grupos comparados	Diferença de médias	SEM	q Value	Prob
L C	0,05471	0,32994	0,2345	1
0 C	0,05109	0,32994	0,219	1
0 L	-0,00362	0,32994	0,01551	1
1 C	-0,69683	0,32994	2,98682	0,37336
1 L	-0,75154	0,32994	3,22132	0,28927
1 0	-0,74792	0,32994	3,20582	0,29443
2 C	-1,22322	0,32994	5,2431	**0,01414**
2 L	-1,27793	0,32994	5,4776	**0,00G37**
2 0	-1,27432	0,32994	5,4621	**0,00G63**
2 1	-0,52639	0,32994	2,25628	0,68614
3 C	-2,10196	0,32994	9,00963	**1,30E-05**
3 L	-2,15667	0,32994	9,24414	**8,40E-06**
3 0	-2,15305	0,32994	9,22863	**8,65E-06**
3 1	-1,40513	0,32994	6,02281	**0,00351**
3 2	-0,87874	0,32994	3,76653	0,14548
5 C	-3,94456	0,32994	16,90755	**2,80E-08**
5 L	-3,99927	0,32994	17,14205	**2,71E-08**
5 0	-3,99565	0,32994	17,12654	**2,72E-08**
5 1	-3,24773	0,32994	13,92073	**4,25E-08**
5 2	-2,72133	0,32994	11,66445	**1,44E-07**
5 3	-1,8426	0,32994	7,89791	**1,04E-04**

ANEXO II – Dados de incorporação de FS

Curva de calibração de concentração FS por absorbância (abs). A curva de calibração foi utilizada para fazer a correspondência de concentração e abs e posteriormente quantificação de FS recuperado em incorporação total por uma massa de aproximadamente $1x10^8$ células fúngicas.



BuTBO abs

μM	ctrl	**1 min**	**5 min**	blk
100	0,461	0,347	0,396	0,046
50	0,262	0,346	0,390	0,047
25	0,146	0,347	0,378	0,044
12,5	0,100	0,346	0,386	0,055
6,25	0,070	0,340	0,381	0,044
3,125	0,053	0,332	0,400	0,045
1,5625	0,047	0,325	0,412	0,044
0,78125	0,045	0,338	0,398	0,043
Média		**0,3401**	**0,3926**	0,046
Desvio padrão SD		**0,0081**	**0,0111**	

ANEXO III – SOBREPOSIÇÃO DE IMAGEM

Figura complementar à Figura 11 com alterações no contraste para demonstrar de forma mais precisa o acúmulo de FS no interior das células fúngicas.

