UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – BIOFOTÔNICA

CAROLINA MONTOVAM MONTEIRO

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO CONTENDO AZUL DE METILENO ASSOCIADO A POLÍMERO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ODONTOLÓGICA

São Paulo, SP
2024

CAROLINA MONTOVAM MONTEIRO

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO CONTENDO AZUL DE METILENO ASSOCIADO A POLÍMERO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ODONTOLÓGICA

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

Orientadora: Profª Drª Christiane Pavani

São Paulo, SP

2024

Monteiro, Carolina Montovam.

Desenvolvimento de formulação contendo azul de metileno associado a polímero para terapia fotodinâmica antimicrobiana odontológica. / Carolina Montovam Monteiro. 2024.

134 f.

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

Orientador (a): Profª. Drª. Christiane Pavani.

1. Inativação fotodinâmica. 2. Fotoquimioterapia. 3. Azul de metileno. 4. Agregação. 5. Biofilme.

I. Pavani, Christiane. II. Título

CDU 615.831

UNINOVE
Universidade Nove de Julho

São Paulo, 10 de junho de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Carolina Montovam Monteiro

Título da Tese: "Desenvolvimento e otimização de formulação contendo azul de metileno associado a polímero para terapia fotodinâmica antimicrobiana odontológica".

Presidente: PROFª. DRª. CHRISTIANE PAVANI _____

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES _____

Membro: PROFª. DRª. SILVIA CRISTINA NUNEZ _____

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS _____

Membro: PROFª. DRª. FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA _____

Ao meu filho: Pedro, você é luz!

AGRADECIMENTOS

A gratidão é uma sensação incrível e engrandecedora! E eu, mesmo que ainda pequena e com tanto a crescer, me sinto tão grata por tantas coisas e por tanta gente que chega a ser inexplicável e, por mais difícil que seja de mencionar tudo e todos, vou começar agradecendo sobretudo à Vida e quem me brindou com ela, meus queridos pais – Cleusa e Reinaldo – por sempre me proporcionarem amor, aconchego e tantas referências valorosas que até hoje me moldam e disciplinam. Observando seus exemplos do que fazer ou não, ouvindo seus conselhos e histórias, sigo entre erros e acertos sempre em frente, com tanto orgulho de ser filha de vocês e desejando ter o mesmo zelo, ternura, comprometimento, vigor, dinamismo e vitalidade que vocês possuem!

Ao meu marido Ricardo Paulichi Beraldo e meu filho Pedro Monteiro Beraldo, que adaptaram nossa rotina diária para simplesmente encaixar um doutorado, que é claro que acabaram “fazendo” junto comigo. Só foi possível porque vocês me apoiaram e encorajaram. É surreal a compreensão que Ricardo tem de mim, indo além do meu autoconhecimento. Pedro, meu motivo e minha motivação, sempre me dando razões para continuar nas inúmeras vezes que parecia que o único jeito era desistir... até as aulas *online* de Biofotônica teve a oportunidade de assistir junto comigo por gostar do tema, sem contar o tanto que se divertiu tentando corrigir minha pronúncia no inglês. É lindo como a gente se apoia mutuamente em nossos projetos como indivíduos, entrelaçando-os aos nossos objetivos familiares em comum, sempre construindo nossa relação com solidez embasada no respeito, amor, cuidado e admiração recíproca!

À Profª Drª Christiane Pavani por confiar e acreditar em mim, não só orientar e, sim, estimular meu desenvolvimento de forma integral, tanto acadêmico-profissional como pessoal. Tenho certeza de que cada “espremida” foi estrategicamente calculada procurando extrair pouco a pouco o melhor de mim. Todo o processo tem sido transformador e sua real dedicação, amizade, carisma, profissionalismo e humanismo, buscando sempre me lapidar, com sua conduta modelo, inspiradora e admirável, certamente contribuiu ainda mais para minha formação. Obrigada por segurar minha mão nessa trajetória e por iluminar os caminhos quando não pude enxergar a direção!

Ao Prof. Dr. Rodrigo Labat, Profª Drª Adriana Lino, Profª Drª Silvia Nunez, Prof. Dr. Renato Prates e Profª Drª Francine Cristina Silva Rosa por aceitarem participar das bancas avaliadoras nas qualificações e na defesa, realizando consideráveis contribuições. Cada pontuação recebida é aceita como uma análise crítica para aprimorar meu aprendizado, aprofundar a pesquisa e concretizar essa realização. Muito obrigada!

A todos demais professores da casa e também aos docentes convidados que ministraram aulas e palestras de excelência, compartilhando suas experiências com conteúdos interessantes e enriquecedores. Em especial, agradeço à Profª Céline Frochot por colaborar no artigo fruto dessa tese.

Aos pesquisadores e palestrantes de todos os congressos que tive o privilégio de participar apresentando as etapas evolutivas desta pesquisa, sempre favorecendo uma visão experiente a cada avaliação feita.

Ao professor Dimi que teve a desafiadora missão de tornar possível alguém se comunicar em inglês, em menos de 1 ano. Jamais pude imaginar que seria capaz de realizar apresentações em outra língua e ainda receber premiações por isso. *Mr. Gist, you made me Wonder and so much more*!

Ao “velho” amigo Denilton Costa por ter me indicado para uma vaga de trabalho na Uninove que, na verdade, foi o que abriu as portas para iniciar esse doutorado. E a “culpa” disso foi do Fernando Azevedo Garcia que, literalmente, me colocou nessa enrascada quando veio a pandemia e a vaga de trabalho “simplesmente já era”... Resumindo, sou eternamente grata por ter visto em mim o potencial para encarar essa árdua jornada, ter me apresentado o programa de pós-graduação e incentivado a dar o primeiro passo lá em 2020 para escrever o pré-projeto a ser submetido ao processo seletivo e me animar a agarrar a oportunidade bem num momento delicado e rodeado de tantas incertezas.

Agradeço às farmácias com manipulação parceiras e aos colegas farmacêuticos que forneceram acesso à compra a preço de custo das matérias-primas necessárias ao desenvolvimento das formulações nesta pesquisa. Especialmente à querida amiga Carolina Uchiya, sua irmã Cássia e toda equipe da Pharma & Equilíbrio, por sempre manter as portas abertas do laboratório de sua farmácia, onde fui inúmeras vezes formular boa parte das preparações.

Agradeço ao Prof. Dr. Maurício Baptista e à Profª Drª Iolanda Midea Cuccovia por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos no Instituto de

Química da USP para execução de análises físico-químicas nas formulações desenvolvidas. À Drª Helena Junqueira por todo seu conhecimento e experiência compartilhada e, à doutoranda Laura Mortara por me acompanhar na realização dos testes de viscosidade e densidade.

Aos colegas de turma, de laboratório, de eventos e congressos, especialmente aos do nosso grupo de pesquisa... cada um com suas vivências e objetivos, dividindo as aflições e conquistas em prol da ciência. Sou grata, particularmente ao Marcelo Gonçalves por se dispor em ir até o laboratório da Universidade e me situar, indicando basicamente onde ficava cada coisa e me dando informações triviais. Parece pouca coisa, mas foi tão essencial e significativo! Agradeço também à Gabriela Machado por demonstrar os procedimentos de sua pesquisa que foram fundamentais para delinear os processos da fase microbiológica aplicados neste trabalho. E à Núbia por sua solicitude ao longo do período que estive realizando as atividades laboratoriais.

Agradeço às alunas de iniciação científica que tive a oportunidade de direcionar, explicando sobre a pesquisa e suas aplicações, além de poder treiná-las para as apresentações que fizeram nos Encontros de IC e Seminários de Pesquisa e, com isso, comprovar como é recompensador multiplicar o conhecimento e disseminar ciência! Minha gratidão especial à Lorena Pinheiro que foi além, cumprindo estágio e acompanhando toda a parte microbiológica da minha pesquisa, participando ativamente dos experimentos e aturando toda minha exigência e rigor científico, repetindo e refazendo quantas vezes fossem necessárias até validarmos os resultados, sempre com presteza e sede de conhecimento. Mais que ensinamento, houve muito aprendizado!

Agradeço a cada pesquisador que ao longo desse processo tive a honra e privilégio de conhecer e trocar informações, por ter assimilado conteúdos técnicos e científicos diretamente da fonte. Há um mundo enorme a explorar!

Aos amigos e familiares por compreenderem as inúmeras renúncias necessárias nesse período e que com leveza e alegria, oxigenam o dia a dia trazendo momentos de paz e descontração, dando pleno sentido à vida.

À Uninove pela oportunidade e pelo financiamento. E à Capes pelo fornecimento da bolsa de estudos.

Deixo, por fim, com muita alegria, minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização deste trabalho. Obrigada!

“Existe apenas uma luz na ciência,
e acendê-la em qualquer lugar
é iluminar todos os lugares”.

Isaac Asimov

RESUMO

O azul de metileno (AM) é um composto fenotiazínico catiônico com propriedades interessantes para aplicação na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Sua característica de agregação direciona os mecanismos de ação fotoquímicos e pode ser favorecida conforme o meio no qual está veiculado. Adicionalmente, dificuldades em manter uma solução em sítios específicos na cavidade bucal durante o período de pré-irradiação motivaram o desenvolvimento de uma formulação com maior viscosidade visando aumentar o tempo de permanência no local e preservando as propriedades fotoquímicas do AM. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver formulação de AM para aPDT associado a biopolímeros mucoadesivos de diferentes caráteres iônicos: hidroxipropilmetilcelulose e carboximetilcelulose (CMC), bem como, ao surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). O estado de agregação do AM foi avaliado por meio da determinação espectrofotométrica da razão dímero/monômero (D/M). A viscosidade e a densidade das formulações, a influência do pH e de três concentrações do AM na razão D/M foram analisadas. Testes microbiológicos *in vitro* foram conduzidos em biofilme de *Candida albicans* (ATCC 10231). No experimento de incorporação as amostras foram tratadas com AM veiculado em água ou em formulação e o tempo de pré-incubação avaliado foi de 5, 10, 30 e 60 min. A viabilidade foi avaliada em água em pH ácido, fórmula, AM a 0,005% e a 0,010%, em água e em fórmula. Após 5 min no escuro, o biofilme foi lavado e irradiado por 27 ou 54 min. Diluições foram incubadas e as unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foram contadas. A formulação selecionada teve sua estabilidade avaliada por um ano através de testes organolépticos, pH, quantificação do monômero de AM e razão D/M. Resultados indicam menor razão D/M com o aumento da concentração dos polímeros sem SDS, entretanto com a adição do surfactante, há ainda maior redução de D/M para os dois polímeros estudados, sendo observada menor agregação do AM na formulação ácida com CMC e SDS. As menores concentrações de AM favorecem menor agregação, sem diferença estatística entre 0,002% e 0,005%. O AM veiculado em água apresenta maior incorporação que em fórmula. A viabilidade em biofilme de 24h resultou significativa redução apenas para a formulação contendo 0,005% de AM. Já em biofilme de 48h, todas as amostras de AM, em água ou fórmula, apresentaram redução significativa, sendo que duas irradiações sucessivas de 27 min com duplo tratamento foi mais eficaz que a única de 54 min, alcançando redução média máxima de 4,26 Log para a fórmula de AM 0,005%, demonstrando que a menor incorporação não afetou a ação antimicrobiana para essa amostra. A formulação otimizada se manteve estável por 1 ano nos atributos características organolépticas, pH e quantificação de AM. Entre 6 e 12 meses, a razão D/M apresentou diferença estatística, embora possa não ter relevância uma vez que os valores obtidos foram muito próximos. Portanto, a associação de adjuvantes farmacotécnicos, a carga iônica do polímero, a concentração do AM e o pH do meio no qual é veiculado influenciam seu comportamento de agregação, sendo seguro o emprego da formulação otimizada desenvolvida por 12 meses após a fabricação e efetiva para aPDT conforme avaliações *in vitro* de viabilidade em biofilme de *C. albicans* com tempo de pré-irradiação de 5 min e 2 irradiações sucessivas conforme parâmetros estabelecidos, sem prejuízo da efetividade antimicrobiana e com a vantagem de favorecer maior retenção no local aplicado. Estudos adicionais podem ser realizados, visando a otimização da dosimetria a fim de alcançar melhor desempenho para aPDT clínica.

Palavras-chave: inativação fotodinâmica; fotoquimioterapia; azul de metileno; agregação; biofilme.

ABSTRACT

Methylene blue (AM) is a cationic phenothiazine compound with interesting properties for application in antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). Its aggregation characteristic directs the photochemical action mechanisms and can be favored depending on the medium in which it is transmitted. Additionally, difficulties in maintaining a solution in specific locations in the oral cavity during the pre-irradiation period motivated the development of a formulation with higher viscosity in order to increase the residence time in the location and preserve the photochemical properties of AM. The objective of this research was to develop AM formulation for aPDT associated with mucoadhesive biopolymers of different ionic characters: hydroxypropylmethylcellulose and carboxymethylcellulose (CMC), as well as the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). The AM aggregation state was evaluated by spectrophotometric determination of the dimer/monomer (D/M) ratio. The viscosity and density of the formulations, the influence of pH and three AM concentrations on the D/M ratio were analyzed. In vitro microbiological tests were conducted on Candida albicans (ATCC 10231) biofilm. In the incorporation experiment, the samples were treated with AM conveyed in water or in a formulation and the pre-incubation time evaluated was 5, 10, 30 and 60 min. Viability was evaluated in water at acidic pH, formula, AM at 0.005% and 0.010%, in water and in formula. After 5 min in the dark, the biofilm was washed and irradiated for 27 or 54 min. Dilutions were incubated and colony forming units per mL (CFU/mL) were counted. The selected formulation had its stability evaluated for one year through organoleptic tests, pH, AM monomer quantification and D/M ratio. Results indicate a lower D/M ratio with increasing concentration of polymers without SDS, however, with the addition of surfactant, there is an even greater reduction in D/M for the two polymers studied, with less aggregation of AM observed in the acidic formulation with CMC and SDS. Lower AM concentrations favor less aggregation, with no statistical difference between 0.002% and 0.005%. AM conveyed in water presents greater incorporation than in formula. Viability in 24h biofilm resulted in a significant reduction only for the formulation containing 0.005% AM. In a 48-hour biofilm, all AM samples, in water or formula, showed a significant reduction, with two successive 27-min irradiations with double treatment being more effective than the single 54-min irradiation, reaching a maximum average reduction of 4.26 Log for the 0.005% AM formula, demonstrating that the lower incorporation did not affect the antimicrobial action for this sample. The optimized formulation remained stable for 1 year in terms of organoleptic characteristics, pH and AM quantification. Between 6 and 12 months, the D/M ratio showed a statistical difference, although it may not be relevant since the values obtained were very close. Therefore, the association of pharmacotechnical adjuvants, the ionic charge of the polymer, the AM concentration and the pH of the medium in which it is conveyed influence its aggregation behavior, making it safe to use the optimized formulation developed for 12 months after manufacturing and effective for aPDT according to in vitro viability assessments in C. albicans biofilm with a pre-irradiation time of 5 min and 2 successive irradiations according to established parameters, without compromising antimicrobial effectiveness and with the advantage of favoring greater retention at the applied site. Additional studies can be carried out, aiming to optimize dosimetry in order to achieve better performance for clinical aPDT.

Keywords: photodynamic inactivation; photochemotherapy; methylene blue; aggregation; biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama de Jablonski.....	22
Figura 2	Espectros de absorção de dímeros e monômeros de AM.....	25
Figura 3	Fluxograma do projeto.....	43
Figura 4	Esquema de preparo das formulações partindo de uma mesma concentração de AM, contendo diferentes concentrações do polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de SDS.....	47
Figura 5	Esquema de preparo das formulações partindo de uma mesma concentração de AM, contendo diferentes concentrações do polímero aniônico CMC, na presença ou ausência de SDS.....	48
Figura 6	Esquema de obtenção das formulações em pH ácido, neutro e básico, partindo de uma mesma amostra de cada preparação.....	52
Figura 7	Esquema de preparo das formulações em diferentes concentrações de AM, partindo de uma mesma concentração de CMC na presença de SDS.....	53
Figura 8	Resumo dos grupos e condições de aPDT avaliadas nos testes microbiológicos.....	55
Figura 9	Espectros dos protótipos formulados com 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS....	60
Figura 10	Razões D/M dos protótipos contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS.....	61
Figura 11	Espectros das formulações contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS.....	63
Figura 12	Razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS.....	64

Figura 13 Espectros das formulações contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero aniônico CMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS..... 66
Figura 14 Razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero aniônico CMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS..... 67
Figura 15 Comparação das razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico (HPMC) e aniônico (CMC) na ausência ou presença de 0,25% de SDS..... 68
Figura 16 Comparação das viscosidades (cP) das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações (inferior, médio e superior) de polímero não-iônico (HPMC) e aniônico (CMC)..... 69
Figura 17 Comparação das viscosidades (cP) das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados de acordo com as concentrações (%) de polímero não-iônico (HPMC) e aniônico (CMC)..... 70
Figura 18 Espectros das formulações contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, em pH ácido, neutro e básico..... 72
Figura 19 Razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, em pH ácido, neutro e básico..... 73
Figura 20 Espectros das formulações contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero aniônico CMC, em pH ácido, neutro e básico..... 74
Figura 21 Razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero aniônico (CMC), em pH ácido, básico e neutro..... 75

Figura 22 Comparação das razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero não-iônico (HPMC) e aniônico (CMC), em pH ácido, neutro e básico..... 76
Figura 23 Espectros das formulações contendo 0,5% de CMC e 0,25% de SDS veiculadas em pH ácido com diferentes concentrações de AM..... 77
Figura 24 Comparação das razões D/M das amostras contendo 0,5% de CMC e 0,25% de SDS veiculados em pH ácido com diferentes concentrações de AM..... 78
Figura 25 Incorporação (%) em biofilme de *C. albicans* de amostras contendo AM 0,005% veiculado em água ou fórmula após período variável de tempo de incubação (min)..... 79
Figura 26 Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 24h de *C. albicans* após 27 min de irradiação..... 80
Figura 27 Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 48h de *C. albicans* após 2 tratamentos de 27 min de irradiação cada..... 81
Figura 28 Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 48h de *C. albicans* após 54 min de irradiação..... 82
Figura 29 Comparação Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 48h de *C. albicans* após 2 tratamentos de 27 min de irradiação ou apenas 1 de 54 min..... 83
Figura 30 pH da formulação ao longo de 12 meses..... 84
Figura 31 Detecção do monômero do AM na formulação em comprimento de onda de 663 nm ao longo de 12 meses..... 85
Figura 32 Razão D/M do AM na formulação em comprimentos de onda de 623/663 nm ao longo de 12 meses..... 85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Polímeros, caráter iônico e concentrações empregados no preparo das formulações..... 44

Quadro 2 – Quantidade empregada da DCHPMC para o preparo de 30 g de cada formulação..... 46

Quadro 3 – Composição dos grupos amostrais das formulações submetidas à avaliação espectroscópica da agregação e respectivos comprimentos de onda (λ)..... 50

Quadro 4 – Composição dos grupos amostrais das formulações submetidas à determinação da viscosidade absoluta viscosidade e densidade..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações do polímero não-iônico HPMC (protótipo)..... 45

Tabela 2 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações do polímero não-iônico HPMC 47

Tabela 3 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações do polímero aniônico CMC..... 48

Tabela 4 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações de AM com CMC e SDS..... 54

Tabela 5 – Descrição quali-quantitativa dos grupos de formulações submetidos aos testes microbiológicos em biofilme de *C. albicans*..... 54

Tabela 6 – Valores de pH das formulações em triplicata..... 70

Tabela 7 – Mediana das triplicatas das análises físico-químicas de estabilidade..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	azul de metileno
AM_05	grupo AM a 0,005% em água pH 5
AM_10	grupo AM a 0,010% em água pH 5
AM_A	grupo AM a 0,005% em água
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	água purificada
aPDT	terapia fotodinâmica antimicrobiana
CMC	carboximetilcelulose
CT	grupo controle pH 5
D/M	dímero/monômero
DCHPMC	dispersão coloidal concentrada de HPMC
DP	desvio-padrão
F_05	grupo fórmula com AM a 0,005% pH 5
F_10	grupo fórmula com AM a 0,010% pH 5
F_Ø	grupo fórmula base sem AM pH 5
F002	formulação com 0,5% de CMC, 0,25% SDS e 0,002% de AM
F005	formulação com 0,5% de CMC, 0,25% SDS e 0,005% de AM
F010	formulação com 0,5% de CMC, 0,25% SDS e 0,010% de AM
FA_Ø	formulação base de CMC sem AM e sem SDS
FA1	formulação com o polímero aniônico CMC a 0,25%
FA2	formulação com o polímero aniônico CMC a 0,5%
FA3	formulação com o polímero aniônico CMC a 1%
FBS	soro fetal bovino
FN_Ø	formulação base de HPMC sem AM e sem SDS
FN1	formulação com o polímero não-iônico HPMC a 1%
FN2	formulação com o polímero não-iônico HPMC a 3%
FN3	formulação com o polímero não-iônico HPMC a 5%
FQ	físico-químico
FS	fotossensibilizador
HPMC	hidroxipropilmetilcelulose
LED	diodo emissor de luz

MP	metilparabeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	polímero aniônico
PBS	tampão fosfato salino
PDT	terapia fotodinâmica
PNI	polímero não-iônico
PPG	propilenoglicol
qs	quantidade suficiente
qsp	quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	espécies reativas de oxigênio
S_0	estado fundamental
S_1	estado excitado singlete
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEAM	solução estoque de AM
T_1	estado excitado triplete
T12	tempo após 12 meses
T6	tempo após 6 meses
TØ	tempo inicial
UFC	unidades formadoras de colônias
UR	umidade relativa
[ ]	concentração

SUMÁRIO

1 CONTEXTUALIZAÇÃO 19
1.1 Terapia Fotodinâmica 21
1.1.1 Fotossensibilizadores 23
1.1.1.1 Azul de metileno 24
1.2 Formulação para uso odontológico 27
1.2.1 Concentração do azul de metileno 28
1.2.2 Conservantes 29
1.2.3 Edulcorantes 30
1.3 Propriedades da formulação 31
1.3.1 Viscosidade da formulação 31
1.3.2 pH da formulação 35
1.3.3 Estabilidade da formulação 37
1.4 Papel da luz na aPDT 39
2 OBJETIVOS 42
2.1 Objetivo geral 42
2.2 Objetivos específicos 42
3 METODOLOGIA 43
3.1 Teste de polímero 44
3.1.1 Formulações contendo o polímero HPMC 45
3.1.2 Formulações contendo CMC 48
3.2 Avaliação espectroscópica da agregação (D/M) 49
3.3 Determinação da viscosidade 50
3.4 Determinação da densidade 51
3.5 Determinação do pH 51
3.6 Avaliação da concentração de AM na formulação selecionada 53
3.7 Testes Microbiológicos 54

3.7.1 Preparo do Biofilme 55
3.7.2 Avaliação *in vitro* de incorporação em biofilme de *Candida albicans* 56
3.7.3 Avaliação *in vitro* de viabilidade em biofilme de *Candida albicans* ... 57
3.8 Testes físico-químicos de estabilidade 58
4 RESULTADOS 60
4.1 Preparo das Formulações 60
4.2 Determinação da razão D/M do AM nas formulações 62
4.2.1 Formulações contendo o polímero HPMC 62
4.2.2 Formulações contendo o polímero CMC 65
4.3 Determinação da viscosidade e da densidade das Formulações 69
4.4 Determinação do pH das Formulações 71
4.5 Determinação da razão D/M do AM nas formulações em função do pH 71
4.5.1 Formulações contendo o polímero não-iônico HPMC em pH variados 72
4.5.2 Formulações contendo o polímero aniônico CMC em pH variados .. 74
4.6 Determinação da razão D/M de diferentes concentrações do AM na formulação selecionada 77
4.7 Avaliação *in vitro* de incorporação em biofilme de *Candida albicans* 78
4.8 Avaliação *in vitro* de viabilidade em biofilme de *Candida albicans* 80
4.9 Estabilidade físico-química da formulação 83
5 DISCUSSÃO 86
6 CONCLUSÃO 98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100
ANEXO A – Laudo analítico de Controle de Qualidade do HPMC 111
ANEXO B – Laudo analítico de Controle de Qualidade do CMC 112
ANEXO C – Gráficos de deconvolução: polímeros HPMC e CMC 113
ANEXO D – Manuscritos publicados 114
ANEXO E – Artigo submetido à publicação 134

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A resistência antimicrobiana é considerada um grave problema de saúde pública (ANVISA, 2021a; WHO, 2022) e uma crescente ameaça global aos ganhos em saúde, sendo categorizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos 10 principais riscos que a humanidade enfrenta atualmente (PAHO, 2019; WHO, 2022).

Considerada como um processo evolutivo normal, a resistência microbiana tem tido um aumento acelerado em consequência ao uso indiscriminado de medicamentos antibióticos, ocasionando significativa mortalidade e morbidade (WHO, 2021). Dados internacionais alertam que cerca de 35% das infecções comuns já apresentam microrganismos com resistência aos medicamentos antimicrobianos disponíveis, podendo esse número alcançar a marca dos 90% especialmente em alguns países de baixa e média renda Cerca de 45% da população mundial possui uma ou mais doenças bucais representando quase 3,5 bilhões de pessoas em todos os países afetando a humanidade em qualquer fase do ciclo de vida (WHO, 2022). O número de óbitos decorrentes da resistência microbiana é expressivo tal como os prejuízos à economia cujo impacto abrange internações mais prolongadas, com cuidados mais intensivos e necessidade de alternativas antibióticas, resultando em ineficácia no tratamento de doenças (ANVISA, 2021a).

Em relatório, a OMS enquadra a saúde oral mundial como uma situação alarmante, concluindo que a mesma requer medidas urgentes (WHO, 2022). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2019) mais de 35 mil pessoas morrem anualmente nos Estados Unidos em decorrência das mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos, tendo os custos hospitalares girado em torno de 35 a 45 bilhões de dólares, enquanto na Europa esse valor pode atingir a marca dos 7 bilhões de euros. Já nos países em desenvolvimento, nos quais a situação é mais grave, a publicação dos dados econômicos é limitada (ANVISA, 2021b) sendo urgentemente necessário adotar tratamentos antibacterianos inovadores (WHO, 2021) inclusive voltados aos cuidados da saúde oral (THOMPSON et al., 2020).

Em se tratando de saúde bucal, a relevância em se atentar às questões relacionadas à resistência antimicrobiana se deve ao fato de os antibióticos estarem entre os medicamentos mais prescritos para infecções bacterianas pelos dentistas, sendo estimada uma taxa de prescrição odontológica aproximadamente de 10% em relação a todas as prescrições dessa classe medicamentosa em escala global (THOMPSON et al., 2020; WHO, 2022).

Considerando que a resistência microbiana frente aos agentes anti-infecciosos representa um problema globalizado de ameaça à saúde pública, outras alternativas terapêuticas se tornam necessárias à opção unicamente farmacológica. Neste sentido a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) demonstra ser um caminho de viabilidade potencial por ser não invasiva, de segurança estabelecida, não específica a microrganismos (amplo espectro de ação) além de não estar relacionada à resistência microbiana (HAMBLIN; HASAN, 2004).

A PDT tem aplicação em diversos campos clínicos (TARDIVO et al., 2005) com a finalidade de tratar doenças e recuperar a saúde, obtendo resultados promissores em pacientes tratados com a mínima invasão e poucos efeitos adversos, quando comparados aos tratamentos convencionais direcionados aos processos infecciosos e até mesmo o câncer, considerando sua principal ação que ocasiona a morte celular, seja de microrganismos ou de células tumorais.

A terapêutica com luz é amplamente utilizada na clínica odontológica, sendo a PDT aplicada, inclusive, como adjuvante para adequada desinfecção do sistema de canais radiculares em cirurgias periapicais e no tratamento endodôntico convencional, com a justificativa de substancial redução da variedade e quantidade de microrganismos nas infeções endodônticas (SIMÕES; CATÃO, 2021). Quando a PDT é utilizada com foco antimicrobiano, costuma-se denominá-la terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*).

Na odontologia a aPDT tem representado uma estratégia importante para uso associado aos protocolos convencionais de desbridamento químico-mecânico com o intuito de potencializar a desinfecção dos canais radiculares (FIGUEIRÊDO JÚNIOR et al., 2021). O emprego da aPDT em pacientes fumantes, cujo comprometimento da cicatrização periodontal representa um fator agravante, é recomendado também como adjuvante ao desbridamento

mecânico, no tratamento da periodontite, apresentando benefícios sutilmente mais elevados quando comparados ao grupo tratado apenas com raspagem e alisamento radicular (FERRO; BARBOSA, 2019).

A aPDT, por atuar na redução da carga microbiana, ou mesmo a sua eliminação, também auxilia na regeneração tecidual, vide que a presença do microrganismo é responsável pela indução do processo inflamatório local (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Já em revisão sistemática visando demonstrar a eficácia da aPDT frente a colonização de múltiplas espécies bacterianas em doenças periodontais e peri-implantares, Lopez *et al*. (2020) concluem que todos os estudos alcançaram significativa redução da quantidade total de carga bacteriana, em média em 99,3%, porém sem alcançar taxa elevada o suficiente para inativação do microrganismo.

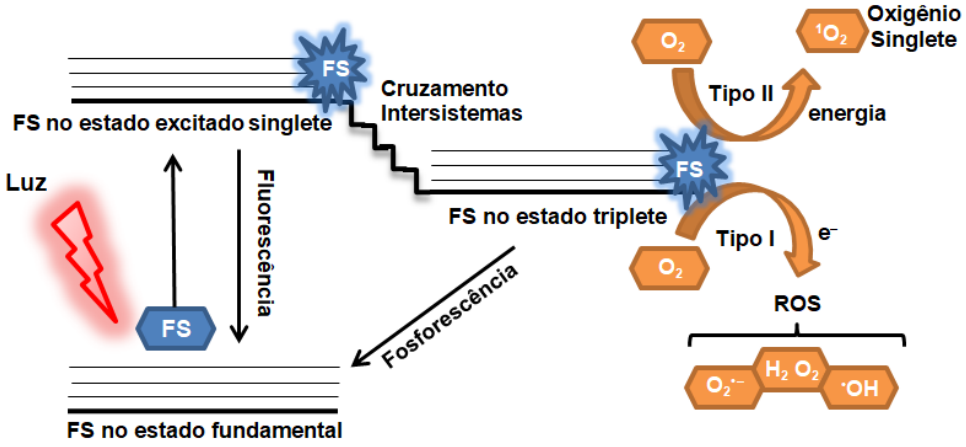
Uma revisão sistemática da literatura concluiu que o tratamento mais eficaz na atualidade para candidíase oral é o uso associado de antifúngicos convencionais e PDT, uma vez que o uso isolado da PDT combate a infecção fúngica ainda num patamar inferior quando comparada ao uso combinado à farmacoterapia. Além disso, esse uso associado pode ser realizado com uma menor dose do antifúngico, tendo a garantia de eficácia e a vantagem de reduzir as possibilidades de resistência microbiana (TEODORO; FERNANDES, 2020).

1.1 Terapia Fotodinâmica

A PDT consiste essencialmente no envolvimento de três elementos: um agente fotossensibilizador (FS), uma fonte específica de luz e a presença de oxigênio (HAMBLIN; HASAN, 2004). É preferencialmente seletiva por células sensibilizadas durante tempo necessário, estando susceptíveis à irradiação da luz, parametrizada em adequados padrões dosimétricos que atuará sobre o tecido provocando reações fotoquímicas capazes de formar espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) que levam à erradicação das células fotossensibilizados.

A Figura 1 traz o Diagrama de Jablonski no qual ilustra os três elementos essenciais da PDT e os passos que se seguem após a interação que ocorre entre eles.

Figura 1 – Diagrama de Jablonski



Fonte: adaptado de Dai *et al.* (2012).

Parte-se da irradiação da luz em comprimento de onda adequado e específico ao FS aplicado no local a ser tratado e que inicialmente se encontra em seu estado fundamental (S_0). Com a absorção da luz, esse FS passará para um estado excitado num nível superior de energia. Esse FS em estado excitado singlete (S_1) tende à perda de energia e poderá prosseguir por alguns caminhos que levarão a essa queda energética através de processos radiativos, cruzamento intersistemas e processos não radiativos. A fluorescência é um processo radiativo que se dá pela emissão de radiação visível a partir do S_1 retornando ao S_0. No cruzamento intersistemas ocorre a transição do S_1 para o estado excitado triplete (T_1). A fosforescência, também é um processo radiativo, no qual ocorre a emissão de radiação visível, assim como na fluorescência, porém com mudança de multiplicidade ocorrendo a partir do T_1 retornando ao S_0. O FS no T_1 apresenta tempo de vida superior em relação ao S_1, diferença de milissegundos ou microssegundos, em relação aos nanosegundos. Neste sentido há maior probabilidade de interação com o meio, incluindo o oxigênio (O_2) e participação da formação de ROS para realizar a ação terapêutica, por meio de dois mecanismos diferentes: do Tipo I ou do Tipo II. As reações do Tipo I desencadeiam processos oxidativos envolvendo transferência de elétrons e produzindo radicais livres e peróxidos. Já nas reações do Tipo II, há transferência de energia do T_1 do FS para o O_2, cujo estado fundamental apresenta-se como oxigênio triplete ($^3O_2$), levando à passagem para seu estado excitado, no qual se apresenta como oxigênio singlete ($^1O_2$), capaz de reagir com outra molécula provocando o dano celular, como resposta terapêutica (SILVA et al., 2017).

Desta forma, os responsáveis pelos danos irreversíveis que levam à morte celular são as ROS, sendo o $^1O_2$ considerado como o principal agente citotóxico na PDT em células tumorais (COLLINA et al., 2018) e os FS com alta capacidade de produção de $^1O_2$ têm sido considerados mais potentes para a PDT (BRITO; SANTOS; NANTES-CARDOSO, 2019). O mecanismo de morte celular na PDT pode variar dependendo do tipo de interface à qual o FS se liga, originando diferentes tipos de agregados que induzem espécies citotóxicas diversas, levando à apoptose quando relacionada à geração de $^1O_2$, ou necrose quando relacionada à geração de radicais (SEVERINO et al., 2003). Hamblin e Hasan (2004) apontam a possibilidade do $^1O_2$ poder se difundir em bactérias ao ser gerado na superfície externa ou muito próximo a ela, e hipotetizam ainda que os FS que agem principalmente via mecanismos do Tipo I precisam penetrar na membrana externa de bactérias gram-negativas. Leveduras, tais como *Candida albicans* são ainda mais resistentes à inativação fotodinâmica devido à presença de uma membrana nuclear que pode apresentar uma barreira adicional para a penetração do FS sendo necessárias doses maiores tanto de luz como de FS (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

1.1.1 Fotossensibilizadores

Os FS são parte essencial na eficácia da aPDT. Para isso, existem algumas características ideais: seletividade para o alvo de tratamento com rápida absorção e acumulação, permanência na região durante tempo adequado para realização do tratamento, seguida de eliminação rápida (SANTOS, 2018).

O emprego de produtos naturais como FS tem sido pesquisado na PDT, sendo os compostos mais amplamente estudados até o momento a Curcumina e a Hipericina, isolados respectivamente dos vegetais *Curcuma* sp e *Hypericum perforatum* (ROCHA; LIMA; YARA, 2020).

As classes de FS mais empregadas na PDT são as porfirinas, clorinas, ftalocianinas além dos fenotiazínicos. As porfirinas apresentam intensa banda de absorção na região de 400 nm, já as clorinas possuem intensa absorção da luz por volta de 650 nm. As ftalocianinas são caracterizadas por baixa hidrossolubilidade e geralmente necessitam ser veiculadas em formulações otimizadas, abrangem ampla faixa de absorção com bandas em 350 nm, 600 nm

e 750 nm. Os fenotiazínicos compõem uma classe de corantes representadas pelo azul de metileno (AM) e azul de toluidina (SILVA et al., 2017) cuja segurança para uso em humanos é uma característica reconhecida (PROCHNOW et al., 2016).

A PDT tem sido muito explorada com potencial aplicabilidade antimicrobiana na área odontológica, sendo o AM um dos principais agentes FS estudados (COLLINA et al., 2018; FILIPINI et al., 2019; TARDIVO et al., 2005), principalmente no Brasil. A PDT empregando AM com finalidade antimicrobiana vem sendo evidenciada na literatura científica, para fins odontológicos ou na medicina como um todo (CECATTO et al., 2020; COLLINA et al., 2018; LEAL et al., 2016; OLIVEIRA-SILVA et al., 2016; SOUSA et al., 2015; TARDIVO et al., 2005; TEODORO; FERNANDES, 2020).

1.1.1.1 Azul de metileno

O corante AM é descrito na edição vigente da Farmacopeia Brasileira como cloreto de metiltionínio de fórmula molecular $C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$ e massa molar de 373,9 g/mol, disponibilizado comercialmente também em outras formas hidratadas (BRASIL, 2019a), sendo o peso molecular da forma anidra equivalente a 319,9 g/mol.

Quando utilizado sem a irradiação de luz, o AM não apresenta toxicidade uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao grupo controle comparativamente aos grupos irradiados em experimentos *in vitro* (LEAL et al., 2016; OLIVEIRA-SILVA et al., 2016), podendo ser considerado um ativo seguro para uso na aPDT (PROCHNOW et al., 2016).

O uso de AM ou a aplicação da luz, não são individualmente capazes de exercer efeito citotóxico ficando evidente que a efetividade da aPDT com AM se dá na aplicação conjunta de FS e luz (SOUSA et al., 2015).

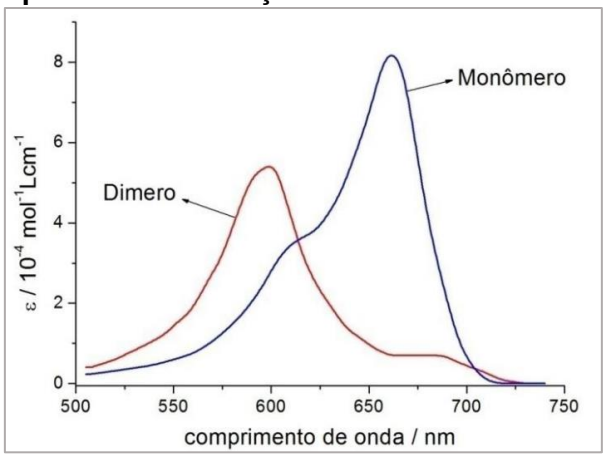
Particularmente o AM demonstra características peculiares com grande potencial de aplicabilidade na PDT (TARDIVO et al., 2005) sendo algumas das vantagens ser um dos poucos FS registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), possuir o máximo de absorção em 660 nm que faz parte da região considerada janela terapêutica de maior aplicabilidade dessa terapia (SILVA et al., 2017) e demonstrar baixa toxicidade no escuro (TANG et al., 2005).

Apesar da aPDT associada ao AM ser considerada eficaz *in vitro*, ainda não foram definidos claramente os melhores parâmetros para sua execução clínica (FILIPINI et al., 2019; TANG et al., 2005). A eficácia terapêutica dessa terapia é dependente do tipo de interação entre o FS e o alvo biológico (TEDESCO; RIBEIRO; PAULA, 2019), sendo essencial considerar a gravidade da infecção, além dos seguintes fatores: concentração do FS, forma farmacêutica e parâmetros de luz (CECATTO et al., 2020).

Embora seja facilmente solúvel em água e etanol, o AM pode demonstrar características hidrofóbicas (OLIVEIRA et al., 2019). A hidrofobicidade apresentada por essa substância faz com que a mesma apresente tendência a formar agregados em função de solventes ou na presença de polieletrólitos (LIMA et al., 2008). O AM pode se apresentar em monômeros ou em dímeros, que é a menor forma agregada, sendo a relação entre elas calculada pela razão dímero/monômero (D/M).

As bandas características de cada um desses estados de agregação podem ser diferenciadas nos espectros de absorção, conforme demonstrado na Figura 2 que destaca o pico de 590 nm para dímeros e de 664 nm para monômeros do AM (BERGMANN; O'KONSKI, 1963).

Figura 2 – Espectros de absorção de dímeros e monômeros de AM



Fonte: Bergmann; O'Konski (1963).

Segundo Bergmann; O'Konski (1963), existe um ombro em aproximadamente 610 nm identificado como um componente vibracional de uma única banda eletrônica que diferencia claramente os espectros do dímero e do

monômero, indicando uma forte interação entre os elétrons das duas moléculas de AM em forma agregada de dímero.

Desta forma, a técnica espectrofotométrica de espectroscopia de absorção eletrônica na faixa de espectro eletromagnético UV-visível é aplicada como análises qualitativa e quantitativa (BRASIL, 2019a) para detectar os estados agregados de AM (COLLINA et al., 2018). O método é fundamentado na absorção de energia eletromagnética por moléculas, com intervalo de frequência na faixa do UV-visível, e depende de fatores como concentração e a própria estrutura química, sendo útil tanto para identificação quanto quantificação de substâncias (BRASIL, 2019a).

A concentração é um fator que interfere na agregação das partículas de AM. Há um equilíbrio entre monômeros e dímeros na solução aquosa de AM, cujo deslocamento se dá para a forma monomérica quando em baixas concentrações e para a forma dimérica, em altas concentrações do FS, sendo a forma monomérica de AM predominante até a concentração de 20 µM, equivalente a 0,0006% (COLLINA et al., 2018). A dimerização do AM é proeminente em água devido à alta constante dielétrica (LEWIS et al., 1943).

A interação do corante fenotiazínico AM com macromoléculas após ser incorporado em células e tecidos pode levar a modificações nas propriedades do estado fundamental desse FS (TADA, 2007). Além disso, a eficiência da fotossensibilização é alterada com a formação de agregados, reduzindo a geração de $^1O_2$ ao ser estimulada pela luz (LIMA et al., 2008). Além disso, o estado de agregação modula o tipo de reação fotoquímica que ocorre e seu mecanismo de ação (COLLINA et al., 2018; TARDIVO et al., 2005). Os monômeros tendem a produzir mais $^1O_2$ enquanto dímeros tendem a produzir mais radicais (JUNQUEIRA et al., 2002).

Resultados de Collina et al. (2018) apontam para a importância do desenvolvimento de formulações que promovam a desagregação do AM, uma vez que o rendimento quântico da produção de $^1O_2$ é bem menor para as formas agregadas (BRITO; SANTOS; NANTES-CARDOSO, 2019). Além disso, os monômeros de AM são mais eficazes na redução do número de células de *Candida albicans in vitro* tanto em suspensão quanto em biofilme, sendo mais eficazes em causar morte celular via $^1O_2$ (COLLINA et al., 2018).

1.2 Formulação para uso odontológico

É importante ressaltar que a auto agregação está relacionada ao solvente, à concentração e à solubilidade do ativo e, os parâmetros físico-químicos da formulação interferem diretamente na fotofísica do AM (LIMA et al., 2007). Prochnow et al. (2016) destacam que a eficácia clínica da aPDT precisa ser otimizada e que o emprego de etanol na formulação com AM pode proporcionar o aumento desse efeito.

Formulações de AM contendo etanol apresentaram maior efeito antimicrobiano, sendo esse resultado alcançado devido o etanol gerar menor agregação molecular do AM com maior proporção de monômeros em relação aos dímeros, além de haver maior produção de $^1O_2$ (FILIPINI et al., 2019) cuja meia-vida é elevada em cinco vezes aproximadamente, na presença de etanol do que na solução aquosa, fenômeno esse que fornece maior tempo de interação entre o $^1O_2$ e as células microbianas (PROCHNOW et al., 2016).

Considerando a necessidade de controle da agregação do AM, Pavani et al. (2017) desenvolveram um enxaguatório bucal composto por AM como princípio ativo que será fotoativado em comprimento de onda de 660 nm para PDT com finalidade antimicrobiana. A associação de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*), em concentração entre 0,5% e 2% como agente surfactante visa modular a agregação do FS, estabelecendo um controle da relação entre monômeros e dímeros, além de favorecer a limpeza superficial dos dentes e contribuir com a ação antimicrobiana (COLLINA et al., 2018; PAVANI et al., 2017), obtendo eficácia perante biofilmes de *Candida albicans* (COLLINA et al., 2022).

O controle da agregação foi obtido por meio da combinação de AM com o surfactante SDS. Os surfactantes são moléculas que ficam adsorvidas nas interfaces com atividade de superfície, reduzindo a energia livre das partículas coloidais e consequentemente a tensão interfacial. Diante desse perfil, esses tensoativos capazes de formar micelas, adquirem diversas funções: ação detergente, agente de espuma, molhante, dispersante, emulsionante e solubilizante (ALLEN JR et al., 2012).

Diferentes concentrações de SDS permitem modular a formação de agregados do FS, sendo utilizado 0,25% por Collina et al. (2018) com eficiente

controle da agregação, sem, no entanto, ser capaz de provocar morte celular quando empregado isoladamente (COLLINA et al., 2020, 2022).

O AM forma complexos com o surfactante SDS devido atração eletrostática (JUNQUEIRA et al., 2002). Com o aumento da concentração de SDS, atinge-se a concentração micelar crítica de modo que são formadas micelas. O excesso de micelas de surfactante em relação ao FS leva a uma predominância da formação de monômeros e na situação oposta há a predominância de dímeros (COLLINA et al., 2018). O equilíbrio entre monômero e dímero induzido pelas micelas é um aspecto determinante para definir as propriedades fotoquímicas do sensibilizador, podendo deslocar de um mecanismo Tipo II para o Tipo I, conforme descreve Junqueira et al. (2002). Consequentemente, a eficiência do tratamento da PDT pode ser otimizada através do melhoramento da formulação desenvolvida. Neste sentido, outros adjuvantes farmacotécnicos podem ser empregados como forma de solucionar algumas dificuldades observadas na prática clínica, tal como a estabilidade da formulação em condições fisiológicas e a viscosidade da formulação.

Aumentar a viscosidade possibilita a obtenção da consistência adequada para aplicação e permanência no local desejado. Este é um fator importante para garantir a retenção no local aplicado e liberação gradual do ativo para realizar sua ação sem ser rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar (TORRES et al., 2000).

1.2.1 Concentração do azul de metileno

A concentração de AM é um dos parâmetros que influenciam na eficácia da aPDT e ainda não há consenso em termos da quantidade a ser utilizada. Diversas concentrações de AM como FS são descritas na literatura, com aplicações *in vitro* e *in vivo*, sugerindo uma indefinição de dose padronizada que ofereça seguramente o melhor emprego na prática clínica odontológica.

A ANVISA considera a concentração de até 1% do AM segura, classificando-a como medicamento de baixo risco sujeito à notificação simplificada (BRASIL, 2006, 2016; TEDESCO; RIBEIRO; PAULA, 2019).

Em estudo *in vitro,* foi constatado que a PDT com AM em concentração de 50 µM (0,0016%) é capaz de provocar a morte celular de forma proporcional

à quantidade de luz empregada. A irradiação de diodo emissor de luz (LED, do inglês *Light Emitting Diode*) durante 2 minutos reduziu 100% de *Streptococcus mutans*, bactéria presente no desenvolvimento da cárie, concluindo que a inativação é diretamente dependente da fluência empregada (LEAL et al., 2016).

Soluções de concentração 250 µM (0,008%) de AM foram avaliadas por Prochnow et al. (2016), sendo observado maior efeito antimicrobiano em formulações associadas ao etanol.

Silva et al. (2020) utilizaram o AM a 1% como fotossensibilizante em terapia não invasiva com laser em clínica odontológica associada à raspagem sub e supragengival, obtendo melhora expressiva do quadro de displasia cemento óssea periapical na qual foi observada minimização da lesão e restituição óssea, devido redução de microrganismos no local da lesão.

Garcez et al. (2016) relatam que menores concentrações de AM, entre 50 µM e 100 µM, (equivalentes a cerca de 0,0016% e 0,003%) são capazes de promover maior formação de ROS após irradiação, quando comparadas às concentrações de 150 µM e 300 µM (equivalentes a cerca de 0,005% e 0,010%) do FS. Isto se dá visto que nessas mais elevadas concentrações há formação de escudo óptico minimizando o efeito fotodinâmico, por impedir que a luz alcance o volume total de AM. Ademais, a solução mais concentrada do FS penetra com maior dificuldade nos túbulos dentinários e causa comprometimento estético devido manchamento do dente.

Em estudo sobre os efeitos da PDT em biofilmes de *Enteroccus faecalis,* (LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2015) a dose empregada foi de 0,005% de AM e o veículo utilizado foi tampão fosfato salino associado a agente de viscosidade mucoadesivo, ressaltando a variedade de doses empregadas do FS, bem como os meios de veiculação e diversidade de fluidez das preparações.

1.2.2 Conservantes

A seleção do sistema conservante de uma formulação deve levar em conta não somente a prevenção do crescimento microbiano e contaminação da formulação, mas também sua capacidade hidrossolúvel, seu pH de ação, sua compatibilidade com demais componentes e ativos veiculados, a não interação com o material de acondicionamento, sua segurança e ausência de toxicidade

(ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007), devendo considerar ainda seu espectro de ação (BRASIL, 2012).

Pinto, Kaneko e Pinto (2015) afirmam que o grupo mais popular é o do parabeno e, sugerem o emprego desse conservante na concentração acima de 0,4% para o éster utilizado isoladamente, ou 0,8% para mistura de ésteres.

Parabenos são incompatíveis com álcalis e sais de ferro, apresentando certa redução de sua atividade conservante em associação a insumos aniônicos e tensoativos não-iônicos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Conservantes de natureza ácida, tais como ácido sórbico, ácido benzóico e dehidroacético, apresentam eficácia na forma não dissociada, em pH inferior a 6, uma vez que tendem a perder ação em pH neutro a alcalino. Já em preparações alcalinas o ideal é utilizar conservantes a base de amônios quaternários (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Na formulação de Pavani et al. (2017) há a adição de metilparabeno a 0,1% para ação conservante, com o intuito de preservar a preparação com finalidade clínica, evitando a contaminação microbiana do produto e contribuindo para sua estabilidade microbiológica durante todo o prazo de validade.

Dessa forma, o parabeno será inicialmente mantido na formulação desenvolvida nesse estudo, conforme as particularidades da preparação a fim de assegurar que não tenha incompatibilidade entre as substâncias.

1.2.3 Edulcorantes

É fundamental que qualquer forma farmacêutica de uso oral seja agradável ao paladar do paciente sendo para tanto, considerado o emprego de edulcorantes e flavorizantes com o propósito de mascarar o sabor (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007; THOMPSON; DAVIDOW, 2009).

Adicionalmente, outros componentes foram associados à formulação desenvolvida por Pavani et al. (2017) com finalidade de edulcorar, melhorando sua palatabilidade e aceite pelo paciente, através do emprego de sacarina sódica a 0,75% ou sorbitol a 20%.

A redução de uso de açúcares em medicamentos de uso oral é recomendada devido risco de erosão e cárie dentária, sendo sugerida a substituição por xilitol, sem que seja influenciada a estabilidade dos ativos da

formulação (SINGANA; SUMA, 2020), uma vez que é capaz de evitar a desmineralização óssea e dos dentes, prevenir inflamação e infecções, apresentando ainda atividade como carreador de fármacos, vinculada à sua natureza atóxica e elevada permeabilidade (AHUJA et al., 2020).

O xilitol representa uma alternativa para edulcorar a preparação, devido seu poder adoçante semelhante à sacarose, tendo o grande diferencial de ser não cariogênico, por promover redução na adesão de placa e comprometimento do crescimento de bactérias cariogênicas (AHUJA et al., 2020; APPEL; RÉUS, 2005; BASTOS et al., 2005), sendo específico para *Streptococcus mutans* (GONÇALVES et al., 2001; TORRES et al., 2000). Além de ser edulcorante, o xilitol possui propriedades antimicrobianas podendo ser empregado também para evitar a contaminação microbiana de preparações (AHUJA et al., 2020).

A concentração de 1% do monoéster de xilitol C-8 em loção com pH 5,5 foi considerada eficaz como conservante para reduzir a contagem de bactérias e *Candida albicans,* com mesma atividade contra *Aspergillus niger* em pH 7,0 (AMARAL et al., 2011).

Propriedades como a viscosidade também podem influenciar no quesito do melhoramento da palatabilidade, sendo que com o aumento da consistência, haverá menor contato da formulação com as papilas gustativas, contribuindo para o mascaramento do sabor (THOMPSON; DAVIDOW, 2009).

1.3 Propriedades da formulação

No delineamento da formulação são determinadas as propriedades físico-químicas que devem ser asseguradas desde o preparo até o prazo final de validade do produto desenvolvido. Para tanto, os aspectos relacionados à viscosidade, pH e estabilidade são fundamentais para estabelecer as características mais adequadas à preparação.

1.3.1 Viscosidade da formulação

É essencial considerar durante o desenvolvimento da formulação, as propriedades reológicas da forma farmacêutica responsáveis por modular os sistemas de liberação e distribuição do fármaco. A vantagem de se elevar a

viscosidade de preparações líquidas é a possibilidade de obter a consistência adequada para aplicação e permanência no local desejado.

Assegurar a entrega do FS em concentração adequada no local infectado é uma etapa crítica, sendo essencial a administração de uma formulação apropriada (SHARMA; DUBE; MAJUMDER, 2021). A substantividade será maior para soluções de alta viscosidade comparativamente às de baixa viscosidade (SAKAE et al., 2018), sendo esse um fator importante para garantir a retentividade no local de aplicação para gradativa liberação para realizar sua ação sem ser rapidamente afetado pelo fluxo salivar (TORRES et al., 2000).

Com o intuito de evitar a perda de FS fluido durante a aplicabilidade na clínica odontológica, é importante considerar a capacidade de retenção do produto na bolsa periodontal, por exemplo, para melhorar o efeito terapêutico. Para isso será feito o uso de polímeros viscosos capazes de promover bioadesão (LIN; DING; CHEN, 2021). Os polímeros são macromoléculas de cadeia linear ou ramificada que interagem com moléculas de água formando dispersões coloidais hidrofílicas estruturadas que contribuem para o aumento de viscosidade de soluções (THOMPSON; DAVIDOW, 2009).

Os polímeros são substâncias capazes de alcançar as características ideais de viscosidade (ALLEN JR et al., 2012; THOMPSON; DAVIDOW, 2009) a serem determinadas de acordo com as necessidades da clínica odontológica. Espera-se que no momento da aplicação do produto haja redução da viscosidade da formulação polimérica devido as forças de cisalhamento empregadas, cujo perfil reológico inicial de maior viscosidade é restabelecido após a administração, devido ao emaranhamento das cadeias poliméricas (SILVA; COOK; BRUSCHI, 2020).

Polímeros solúveis em água, além de aumentarem a viscosidade, apresentam atividade de superfície e características emulsionantes (ALLEN JR et al., 2012). Os agentes que possuem atividade de superfície também são denominados de tensoativos ou surfactantes, sendo vantajosa essa dupla função farmacotécnica (THOMPSON; DAVIDOW, 2009).

São classificados em três grupos: polímeros naturais, como as gomas arábica, adraganta, xantana e alginato de sódio; polímeros derivados semi-sintéticos da celulose, como a metilceluose, carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC); e, polímeros

sintéticos, como os carbômeros e os poloxâmeros (THOMPSON; DAVIDOW, 2009). Desta forma, uma gama enorme de possibilidades está disponível para escolha na etapa do delineamento da formulação, sendo fundamental avaliar, inclusive, o custo-benefício.

Polímeros, naturais ou sintéticos, com propriedades biocompatíveis apresentam larga empregabilidade no desenvolvimento farmacêutico para modular os sistemas de liberação de ativos hidrofílicos ou lipofílicos ao longo de um tempo determinado. Também controlam a penetração nos tecidos, a distribuição intercelular, o reconhecimento molecular e a localização subcelular (TEDESCO; RIBEIRO; PAULA, 2019).

A fim de favorecer a aplicação da formulação na oromucosa, o emprego de polímeros mucoadesivos com propriedades de bioadesão é desejado (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010), facilitando a manutenção da formulação no local aplicado, aumentando o tempo de permanência na mucosa e melhorando os resultados terapêuticos (GARG et al., 2024).

Os sistemas poliméricos, simples e complexos, para veiculação de fármacos FS é indispensável nos estudos atuais de fotoprocessos biológicos (TEDESCO; RIBEIRO; PAULA, 2019).

Um derivado semi-sintético da celulose, a CMC sódica é um polímero aniônico que se apresenta como um pó higroscópico branco a levemente amarelado que forma uma dispersão coloidal clara ao ser hidratada após cerca de 2 horas de contato com a água, permanecendo estável numa faixa de pH mais estreita, entre 5 e 10 (THOMPSON; DAVIDOW, 2009). Com função espessante e aglutinante está presente na composição de dentifrícios para aumento da viscosidade (CATIRSE et al., 2020) e além das propriedades de formação de gel, apresenta bom desempenho mucoadesivo através de fortes ligações de hidrogénio entre os grupos carboxila não ionizados e a mucina, principal glicoproteína encontrada no muco, responsável pelas interações físicas e mecânicas (PEREIRINHA; FIGUEIRAS, 2016; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). A exposição a temperaturas mais elevadas levará à diminuição da viscosidade da preparação contendo CMC (SIGMA-ALDRICH, 2023a), o que é desejado ao aplicar o produto clinicamente (SILVA; COOK; BRUSCHI, 2020).

Estudo utilizando formulação contendo 0,01% de AM solubilizado em 77% de água ultrapura contendo 20% de etanol e 3% de CMC para tratamento

periodontal de ratos diabéticos concluiu que pode haver benefícios com aPDT, apresentando menor infiltrado inflamatório local com menor perda óssea e maior percentual de fibras colágenas ao ser comparado à raspagem e alisamento radicular, considerada padrão-ouro para tratar periodontite (FILIPINI et al., 2019).

A incorporação de biopolímeros, como a metilcelulose, possibilita aumento da viscosidade e retenção do AM no local de aplicação pelo cirurgião dentista superando uma deficiência clínica quando utilizada formulação fluida, que prejudica a fotoinativação (LIN; DING; CHEN, 2021). O hidroximetilcelulose foi o agente de viscosidade mucoadesivo utilizado por López-Jimenez et al. (2015) para veicular o AM em estudos de aPDT.

O baixo tempo de permanência das formulações na cavidade oral é uma limitação do tratamento de infecções bucais. Podendo a retenção ser melhorada com o aumento do tempo de adesão ao veicular o FS em hidrogel, por exemplo (SILVESTRE et al., 2021). Hidrogéis são materiais constituídos por rede polimérica tridimensional com a capacidade de intumescer na presença de água, apresentando propriedades mecânicas de sólidos e transporte difusivo de líquidos. Formam uma rede tridimensional de polímero hidrofílico e são biomateriais com aplicações promissoras por ser biocompatível aos fluidos biológicos (FEKSA et al., 2018). Nadtoka, Virych e Kutsevol (2020) testaram a atividade antibacteriana do AM formulado em hidrogel, observando efeito bactericida e promissora aplicação na aPDT apresentando vantagens de ser atóxico, biocompatível e biodegradável. A capacidade de absorção e dessorção de preparações contendo AM é dependente do tipo de hidrogel utilizado (NADTOKA et al., 2020).

O fato do poloxâmero formar hidrogeis fracos de rápida dissolução, levou Silva, Cook e Bruschi (2020) a associarem o derivado celulósico HPMC para obtenção de melhores propriedades de retenção a partir da interação desses polímeros. O resultado apontou sinergismo reológico com alterações na consistência em temperatura de 25 ºC, sendo considerada de melhor potencial termorresponsivo para aplicabilidade tópica, a concentração de 17,5% de poloxâmero 407 e 3% de HPMC. O polímero não-iônico e semi-sintético HPMC possui ação espessante, tensoativa e emulsificante, empregado para favorecer o controle de entrega de fármacos e elevar a viscosidade de formulações.

Apresenta-se como um pó fibroso levemente esbranquiçado que intumesce em água formando uma dispersão coloidal viscosa, que pode variar de transparente a opalescente a depender da farmacotécnica empregada (THOMPSON; DAVIDOW, 2009).

O comportamento reológico da formulação irá controlar não somente a liberação do fármaco da forma farmacêutica, mas também impactar o fluxo da dispersão durante o processamento de sua obtenção (ALLEN JR et al., 2012).

1.3.2 pH da formulação

O pH é de extrema importância para estudos de fotoxidação em sistemas biológicos sensibilizados por AM, que geralmente são realizados em soluções neutras (BONNEAU et al., 1975).

A formação de $^1O_2$ de soluções aquosas é dependente do pH e afeta a eficiência dos mecanismos de fotossensibilização dos tipos I e II (TARDIVO et al., 2005) podendo ser relevante também na inativação de bactérias. A produção de $^1O_2$ por transferência de energia do AM varia por um fator de aproximadamente cinco para a faixa de pH entre 5 e 9, apresentando variação máxima em torno de pH 7, sendo também constatada a influência do papel do tamponamento nestas soluções (BONNEAU et al., 1975). Desta forma, fatores como concentração de AM e pH da solução são relevantes para aplicações bactericidas em aPDT (HUANG et al., 2019).

O rendimento quântico de formação de $^1O_2$ é muito maior em meio básico comparativamente ao ácido (CHEN; CESARIO; RENTZEPIS, 2011). Num estudo *in vitro* realizado por Huang et al. (2019) foi observado que quanto maior o pH e a concentração de AM empregados, maior o efeito bactericida perante *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *S. mutans*, sendo obtida a maior eficácia com a concentração de 200 µg/mL de AM em pH 10 irradiado durante 60 segundos.

Bonneau et al. (1975) relataram a influência do pH na produção de $^1O_2$, podendo ser cerca de 5 vezes mais eficiente em meio básico do que em meio ácido em soluções saturadas de ar e fortemente tamponadas em comparação com soluções não tamponadas. Chen, Cesario e Rentzepis (2011) observaram

uma taxa de inativação de bactérias gram-positivas e gram-negativas na ordem de 3 a 25 vezes maior em pH 9 do que a taxa alcançada em pH 5.

Por outro lado, Gusman et al. (2018) visando investigar a biocompatibilidade de diferentes níveis de pH de solução de AM a 100 µg/mL através da técnica de implantação em tecido subcutâneo, relataram que o pH ácido pode proporcionar maiores benefícios à aPDT com AM uma vez que a acidez leva à exposição da matriz de colágeno e favorece a reparação e regeneração do tecido periodontal, com melhor biocompatibilidade que o pH 7.

Foi demonstrado por Almeida (2017) que o AM utilizado em aPDT juntamente à raspagem e alisamento radicular é seguro e que o pH do FS influencia no reparo periodontal de ratos, uma vez que os resultados de eficácia obtidos com a aplicação em pH 1,0 foi estatisticamente superior em controlar a perda óssea alveolar quando comparado com o AM em pH 7,0.

Elevar a acidez de uma solução é um método que inibe a síntese de proteínas intracelulares, sendo promissor para inativação bacteriana (LUO et al., 2013).

Assim, o pH é outro aspecto a ser contemplado na caracterização da formulação a ser delineada, produzida e padronizada, com a finalidade de avaliar e obter uma performance mais otimizada. Além disso, é importante considerar que a aplicação clínica será na cavidade oral, cujo pH gira em torno de 8 para a saliva saudável de adultos normais e quando contaminada há maior tendência de acidificação do meio (ECKLEY; COSTA, 2006). Comparativamente aos dentes sem cárie, as superfícies dos dentes cariados apresentam uma diferença média de 1,9 na queda do pH devido à ação acidogênica dos microrganismos (LUNDSTRÖM et al., 2020).

Em termos de biocompatibilidade com o tecido conjuntivo, a solução de AM de concentração 100 µg/mL apresentou melhor avaliação em pH ácido do que neutro, sendo empregado ácido cítrico 60 µg/mL para atingir o pH 1, sendo considerado por Gusman et al. (2018) que o fato de reduzir o pH para um nível que expõe a matriz de colágeno pode elevar os benefícios da aPDT no sentido de reduzir infecção e inflamação, aumentando o processo de reparação. Entretanto, vale ressaltar que tal experimento foi realizado em animal e sem avaliação da fotoquímica.

A determinação potenciométrica do pH, prevista na Farmacopeia Brasileira, se dá pela medida da atividade do íon hidrogênio na formulação (BRASIL, 2019a). Sendo possível, o pH deve ser ajustado para uma faixa de máxima estabilidade, para minimizar as chances de degradação do insumo farmacêutico ativo, principalmente por hidrólise, factível de ocorrer essencialmente em formulações de pH neutro a alcalino, sendo geralmente recomendado acidificar a preparação na faixa de pH entre 5 e 6, para elevar a estabilidade (FERREIRA, 2002).

1.3.3 Estabilidade da formulação

Estudos de estabilidade são projetados para submeter a formulação a testes em função da variação de fatores ambientes, tais como o calor, a umidade e a luminosidade, que possam influenciar a sua qualidade ao longo do tempo. Os ensaios de estabilidade são essenciais para garantir a estabilidade da preparação (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007) sendo previstos como exigência normativa pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019a), cujos critérios estão estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 318/2019, que estabelece os critérios para realizar esses testes em insumos farmacêuticos ativos e medicamentos com a finalidade de verificar se há influência da interação entre os insumos associados na formulação envasada que comprometa suas propriedades físico-químicas, bem como a variação da qualidade da preparação ao ser submetida à influência da temperatura, umidade e luminosidade (BRASIL, 2019b).

Fatores como a temperatura e a luz podem acelerar a velocidade de ocorrência de reações de degradação, afetando a estabilidade da formulação. O mesmo pode ocorrer com o excesso de umidade, que também favorece as reações de hidrólise (FERREIRA, 2002).

A elevação da temperatura pode levar à hidrólise dos parabenos comprometendo sua estabilidade, que também pode ser afetada pela sensibilidade à luz excessiva que esse conservante apresenta (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

São necessárias avaliações das propriedades físicas e químicas do insumo farmacêutico ativo, dos excipientes empregados na formulação, da forma farmacêutica, do processo de obtenção, incluindo a tipificação da embalagem utilizada para acondicionamento, cujo objetivo é averiguar quais atributos são passíveis de sofrer modificação em função do tempo, podendo impactar na qualidade e no desempenho da formulação, além de sugerir as condições de armazenamento e direcionar para indicação do prazo de validade do medicamento elaborado (BRASIL, 2019b).

Tanto na RDC Nº 199/2006, que dispõe sobre os medicamentos de notificação simplificada, bem como na RDC 107/2016 que altera essa normativa, o AM em concentração de 1% faz parte da lista de medicamentos de baixo risco, sendo definidas as especificações analíticas para assegurar a qualidade do medicamento elaborado na forma farmacêutica semissólida como características organolépticas, peso médio, pH, densidade, viscosidade, identificação e teor do princípio ativo, além dos limites microbianos: pesquisa de patógenos, contagem de bactérias e fungos totais (BRASIL, 2006, 2016). As características referenciadas na 2ª edição da Farmacopeia Brasileira e na 32ª edição do Martindale para a formulação de AM descrevem uma solução de coloração azul, com odor característico, sem presença de substâncias em depósito ou suspensão. Como prova de identificação deve-se dosear no mínimo 0,950% e no máximo 1,050% de $C_{16}H_{18}CIN_3S$ (BRASIL, 2006).

A estabilidade dos parabenos é reduzida conforme o pH é aumentado, levando à significante hidrólise em meio fortemente alcalino (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Para o armazenamento de produtos de base aquosa em temperatura ambiente, entre 15°C e 30°C, o estudo de estabilidade de longa duração e acompanhamento exige condição de exposição a 30°C±2°C e 35%UR±5%UR, sendo permitido realizar o teste a 25°C±2°C e 60%UR±5%UR quando o medicamento é destinado ao uso exclusivo em hospitais e clínicas especializadas.

Análises como aspecto, teor e pH devem ser realizadas durante todo o período de validade proposto para a formulação, sendo efetuadas no tempo inicial, trimestralmente durante o 1º ano, a cada 6 meses durante o 2º ano e anualmente após o 3º ano (BRASIL, 2019b).

1.4 Papel da luz na aPDT

Além dos parâmetros relacionados ao FS, também é importante a definição de parâmetros relacionados à luz. É relatado na literatura que a PDT provoca morte celular de microrganismos em mesma proporção da quantidade aplicada de irradiação luminosa (LEAL et al., 2016; OLIVEIRA-SILVA et al., 2016). Neste sentido, padronizações de parâmetros tanto relacionados à formulação do FS quanto de aplicação da luz, são fundamentais para assegurar a aplicabilidade clínica com maior credibilidade e reprodutibilidade.

Há falta de estudos clínicos controlados e randomizados empregando a PDT com AM no tratamento contra o fungo da espécie *Candida albicans* (SOUSA et al., 2015). *In vitro*, a avaliação através de ensaios em biofilme é mais apropriada para comparar as eficácias dos sistemas formulados do que os ensaios em suspensão (COLLINA et al., 2018). Dias et al. (2023) sugerem que a aPDT pode reduzir a virulência do fungo e confirmam que as células em biofilmes são mais tolerantes à aPDT do que em culturas planctônicas, uma vez que a matriz polimérica extracelular em biofilmes do fungo confere proteção adicional às células, protegendo-as do estresse oxidativo, dificultando a penetração do FS nas multicamadas do biofilme e a consequente inativação.

A morte celular de *C. albicans* foi observada de forma proporcional à quantidade de luz entregue conforme experimento *in vitro* com tempo de irradiação de 1, 3 e 6 min, sendo que o pré-tratamento com glicose pode conduzir à resultados de eficácia diversos e completamente opostos, a depender das diferentes cepas irradiadas (OLIVEIRA-SILVA et al., 2016). Da mesma forma, a inativação de *Streptococcus mutans* se mostrou proporcional à quantidade de irradiação luminosa. Por outro lado, na presença de glicose a eficácia da aPDT é bastante reduzida até mesmo com a ampliação da exposição radiante realizada *in vitro* empregando LED e AM (LEAL et al., 2016).

A ação antimicrobiana da PDT utilizando o AM como FS foi avaliada *in vitro*, concluindo que para bactérias gram-negativas, o período de exposição ao FS previamente à aplicação da luz, parece ser um aspecto fundamental para otimizar o efeito dessa terapia sendo que na ausência da pré-incubação dos agentes infecciosos com a substância sensibilizante resultou em ineficácia

terapêutica (GALO et al., 2020). Adequar o tempo de incubação parece ter um enorme impacto na eficácia da aPDT, especialmente em relação às cepas de *C. albicans*, devido ao tamanho dessas células e à presença da parede celular (WIENCH et al., 2021). Nesse sentido, esse tempo prévio pode ser considerado outro fator relevante para a definição de protocolos clínicos específicos para cada microrganismo, sendo que para *C. albicans* o aumento do tempo de pré-irradiação não influenciou na resposta da aPDT (COLLINA et al., 2018, 2020).

A formulação inicialmente desenvolvida por Pavani et al. (2017) apresentou significativa redução de UFC/mL em biofilmes de *C. albicans* com diminuição da virulência das células sobreviventes (COLLINA et al., 2022).

Trabalhos mais recentes de nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando a importância da caracterização dos parâmetros de dosimetria (GONÇALVES et al., 2023) e dos esquemas de aplicação da formulação com AM em aPDT em diferentes estágios de crescimento da levedura *C. albicans* (MACHADO et al., 2023), com o intuito de aumentar a eficácia da inativação microbiana.

Gonçalves et al. (2023) afirmam que a associação de SDS à solução aquosa de AM garante maior ação antimicrobiana perante *C. albicans* até mesmo em parâmetros de menor luminosidade, quando comparada à solução sem o tensoativo, sendo sugerida a utilização de irradiância acima de 26 mW/cm^2 e exposição radiante acima de 18 J/cm^2 nos ensaios de suspensão, a fim de alcançar maior efeito antimicrobiano. Dessa forma, Machado et al. (2023) ao realizar experimentos em biofilmes da levedura *C. albicans* empregaram parâmetros de 37,3 mW/cm^2, 60,4 J/cm^2 e 120,8 J/cm^2, uma vez que a organização em biofilmes dificulta a inativação sendo, além disso, observadas respostas diferentes de acordo com o estágio de crescimento, obtendo maior efeito inibitório em fase de adesão com 27 min de irradiação a 660 nm ao empregar FS associado ao SDS. Já em biofilmes em fase de dispersão, devido à menor susceptibilidade à aPDT, foram necessárias duas aplicações sucessivas da irradiação para alcançar a erradicação do microrganismo. De acordo com Baptista et al. (2017) há uma estreita relação entre o estado fisiológico da *C. albicans* e a eficiência da fotoinativação

A fim de dar continuidade aos experimentos do grupo de pesquisa, no presente estudo a formulação foi otimizada com a associação de polímero mucoadesivo e adjuvantes farmacotécnicos, tendo as características de

agregação do AM, pH, viscosidade, densidade e concentração do ativo analisadas, bem como sendo avaliada a efetividade através de testes microbiológicos de incorporação e viabilidade *in vitro* em biofilme de *C. albicans*, empregando os mesmos parâmetros de irradiação utilizados, além de ter sido determinada a estabilidade físico-química da formulação desenvolvida.

O desenvolvimento de uma formulação de AM aprimorada foi motivado pelo relato de profissionais clínicos que expõem dificuldades ao aplicar a solução completamente líquida, pois escorre e não permanece no local ao longo do período de pré-irradiação, fundamental para o efeito do FS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver formulação contendo AM associado a substâncias poliméricas para aplicabilidade em aPDT odontológica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a agregação do AM por meio da razão D/M da formulação associada a adjuvantes farmacotécnicos em diferentes:

    * Concentrações de polímeros não-iônico e aniônico,
    * Valores de pH,
    * Concentrações do AM;

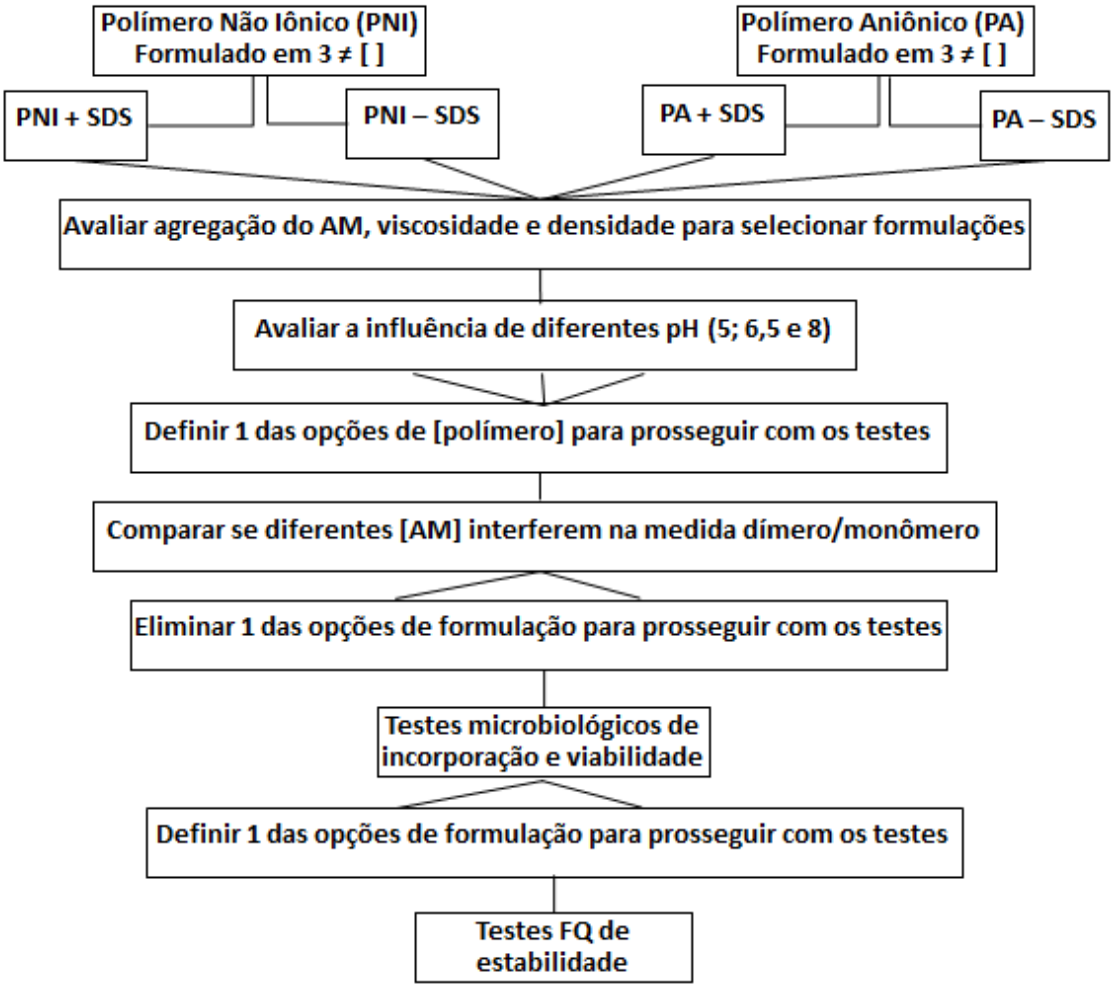
- Realizar estudos *in vitro* de incorporação e viabilidade em biofilme de *Candida albicans*;

- Avaliar a estabilidade da formulação por meio de testes físico-químicos.

3 METODOLOGIA

O projeto se desenvolveu seguindo o fluxograma exposto na Figura 3, tendo sido iniciado pelo preparo de formulações contendo o AM associado a polímeros com propriedades diferentes, de caráter não-iônico e aniônico, além de adjuvantes farmacotécnicos com potencial de melhorar a palatabilidade e ampliar o tempo de prateleira. Para cada preparação elaborada em três diferentes concentrações de cada polímero, foi avaliada a agregação do AM utilizado na formulação a 0,005% contendo ou não 0,25% de SDS e determinada a viscosidade e densidade das formulações, sendo que os resultados obtidos a princípio visaram selecionar quais das opções formuladas iriam prosseguir para os próximos ensaios.

Figura 3 – Fluxograma do projeto



Legenda: PNI = polímero não-iônico. PA = polímero aniônico. SDS = dodecil sulfato de sódio. AM = azul de metileno. FQ = físico-químico. Fonte: própria autoria.

O impacto do pH foi testado, a partir de ajustes para se obter formulações de caráter ácido, neutro e alcalino, sendo avaliada a influência do pH na agregação do AM por meio da razão D/M.

A concentração do polímero escolhida foi formulada com variadas porcentagens de AM que foram submetidas a repetição da avaliação de agregação para detectar se há ou não interferência na razão D/M.

Diante dos parâmetros obtidos, formulações foram selecionadas para avaliar a efetividade fotoquímica através de testes microbiológicos *in vitro* de incorporação e viabilidade em biofilme de *Candida albicans*.

A formulação eleita contendo o FS na concentração definida adicionado ao polímero, tensoativo, edulcorante e preservante, com o pH ajustado, foi submetida a testes de estabilidade físico-químicos.

3.1 Teste de polímero

A formulação foi elaborada a partir da dissolução do AM em água purificada e adição do polímero disperso para formação de uma solução com viscosidade apropriada. Para tanto, três diferentes concentrações de cada polímero foram formuladas em baixa, média e elevada concentração. O polímero de caráter não-iônico testado foi o HPMC e, o CMC foi o polímero de caráter aniônico, sendo preparadas em triplicata cada uma das formulações para serem avaliadas, conforme concentrações descritas no Quadro 1:

Quadro 1 – Polímeros, caráter iônico e concentrações empregados no preparo das formulações

Polímero	Caráter Iônico	[Baixa]	[Média]	[Alta]
HPMC	não-iônico	1%	3%	5%
CMC	aniônico	0,25%	0,5%	1%

Legenda: HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose.
Fonte: própria autoria.

Para cada preparação foi registrada a composição quali-quantitativa utilizada e as alterações subsequentes conforme testes realizados, para adequação da proporção dos insumos da formulação conforme a relação D/M obtida.

3.1.1 Formulações contendo o polímero HPMC

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de AM (SEAM) padronizada a 1 mg/mL (0,1%) a partir da solubilização do FS diretamente na água purificada e completado o volume com o mesmo solvente, a fim de se assegurar uma padronização da diluição a ser empregada em todas as preparações.

Em seguida, uma dispersão coloidal concentrada de HPMC (DCHPMC) foi previamente elaborada a fim de não submeter o AM ao processo de aquecimento. A princípio, como protótipo, foi definida a concentração de 8,33% para esse polímero não-iônico, contendo 0,1% Metilparabeno. Conforme técnica sugerida por Thompson e Davidow (2009), cerca de 35% da água purificada foi aquecida à ebulição para então ser adicionado o polímero HPMC e homogeneizado até completa molhagem do pó e dispersão. O restante da água purificada foi empregado em quantidade suficiente para (qsp) completar o volume necessário, sendo adicionada em temperatura ambiente com agitação, obtendo uma dispersão coloidal intumescida de aspecto claro. Por fim, o metilparabeno previamente solubilizado em propilenoglicol foi adicionado e o sistema homogeneizado.

As formulações desenvolvidas nesse protótipo foram individualmente preparadas, para as três diferentes concentrações do polímero não-iônico, contendo ou não o surfactante SDS, conforme esquematizado na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações do polímero não-iônico HPMC (protótipo)

INSUMOS	FORMULAÇÕES								
	FN1			FN2			FN3		
	A/B/C	D/E/F	FN1Ø	A/B/C	D/E/F	FN2Ø	A/B/C	D/E/F	FN3Ø
AM	0,005%	0,005%	-	0,005%	0,005%	-	0,005%	0,005%	-
MP	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
PPG	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%
Xilitol	1%	1%	-	1%	1%	-	1%	1%	-
HPMC	1%	1%	1%	3%	3%	3%	5%	5%	5%
SDS	-	0,25%	-	-	0,25%	-	-	0,25%	-
AP qsp	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Legenda: AM = azul de metileno. MP = Metilparabeno. PPG = propilenoglicol. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. AP = água purificada. qsp = quantidade suficiente para. FN = formulação com o polímero não-iônico.
Fonte: própria autoria.

Para as formulações intituladas A, B e C (sem SDS), foi inicialmente solubilizado o Xilitol em água purificada e adicionado sobre a quantidade de DCHPMC específica para cada formulação de concentração desejada do polímero conforme descrito no Quadro 2. Foi adicionado 1,5 mL da SEAM e homogeneizado, sendo necessário completar o volume final com água purificada a fim de se obter 30 g.

Quadro 2 – Quantidade empregada da DCHPMC para o preparo de 30 g de cada formulação

Formulação	[HPMC]	Quantidade da DCHPMC
FN1	1%	3,600 g
FN2	3%	10,800 g
FN3	5%	18,010 g

Legenda: FN = formulação com o polímero não-iônico. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. DCHPMC = Dispersão Coloidal Concentrada de HPMC. Fonte: própria autoria.

Para as formulações intituladas D, E e F (com SDS), foi adicionado o Xilitol em água purificada, acrescentado o SDS e solubilizado. Então, essa solução foi vertida sobre a quantidade de DCHPMC específica para cada formulação de concentração desejada do polímero em quantidade correspondente ao descrito no Quadro 2. Individualmente, foi adicionado 1,5 mL da SEAM e homogeneizado, sendo necessário completar o volume final com água purificada obtendo 30 g ao fim do preparo.

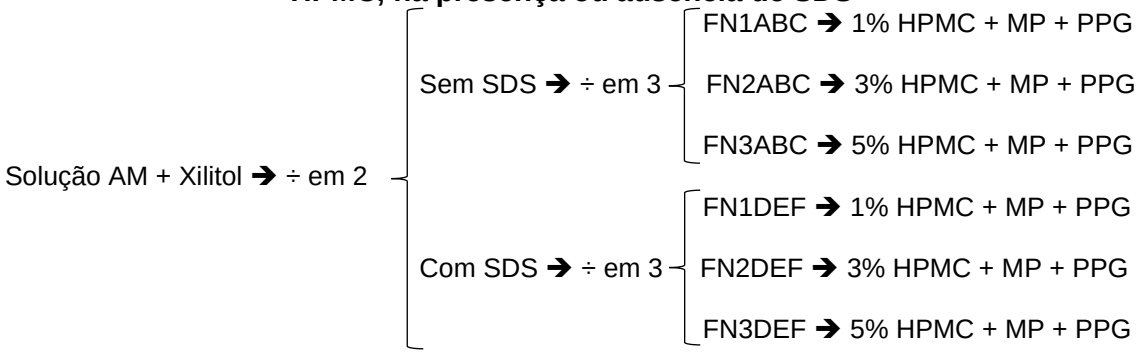
Uma formulação base de cada concentração do polímero não-iônico foi elaborada sem AM e sem SDS para ser utilizada como branco nos experimentos do espectrofotômetro, sendo nomeadas FN_Ø.

Após a padronização da técnica obtida no protótipo, a metodologia foi adaptada e seguiu com a adição do xilitol em maior concentração para oferecer melhor palatabilidade, sendo solubilizado em água e homogeneizado com quantidade apropriada da SEAM. Essa preparação foi dividida em duas porções e em uma delas foi adicionado o SDS previamente solubilizado em água purificada na proporção 1:10. Dessas duas divisões foram extraídas outras três porções de cada, totalizando 6 preparações (Figura 4).

À parte, para não comprometer a estabilidade do AM através do aquecimento necessário para se obter a melhor dispersão e homogeneização do HPMC, a técnica empregada no preparo foi de aquecimento à ebulição de um

terço da água purificada e preparo de uma dispersão coloidal ainda mais concentrada do polímero HPMC a 20%, contendo o metilparabeno previamente solubilizado em propilenoglicol. Essa foi utilizada proporcionalmente para obter as concentrações necessárias de 1%, 3% ou 5% do HPMC, nas seis porções preparadas contendo ou não o SDS, conforme esquematizado na Figura 4:

Figura 4 – Esquema de preparo das formulações partindo de uma mesma concentração de AM, contendo diferentes concentrações do polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de SDS



Legenda: AM = azul de metileno. SDS = dodecil sulfato de sódio. FN = formulação com o polímero não-iônico. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. MP = Metilparabeno. PPG = propilenoglicol. Fonte: própria autoria.

Cada uma das formulações foi preparada individualmente e em triplicata, sendo misturado à solução de AM e xilitol, com ou sem o SDS, a dispersão coloidal mais concentrada de HPMC com metilparabeno e propilenoglicol, sendo por fim o volume completado com água purificada, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – **Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações do polímero não-iônico HPMC**

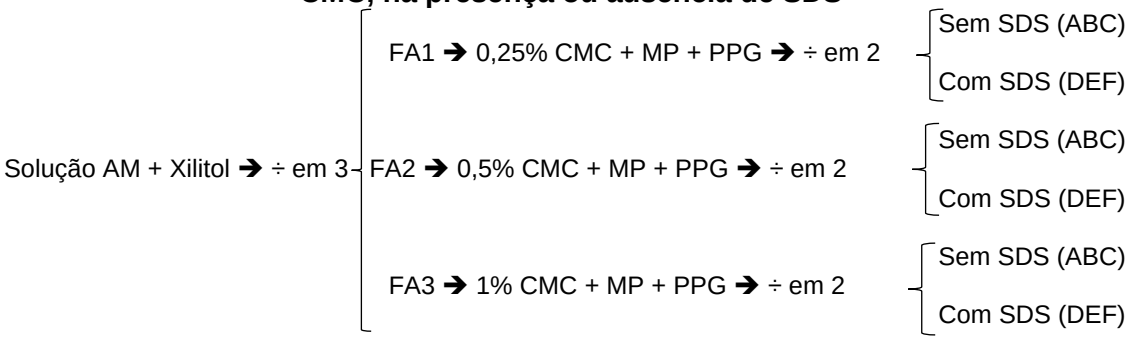
INSUMOS	**FORMULAÇÕES**								
	FN1			**FN2**			**FN3**		
	A/B/C	**D/E/F**	**FN1Ø**	**A/B/C**	**D/E/F**	**FN2Ø**	**A/B/C**	**D/E/F**	**FN3Ø**
AM	0,005%	0,005%	-	0,005%	0,005%	-	0,005%	0,005%	-
MP	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
PPG	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%
Xilitol	5%	5%	-	5%	5%	-	5%	5%	-
HPMC	1%	1%	1%	3%	3%	3%	5%	5%	5%
SDS	-	0,25%	-	-	0,25%	-	-	0,25%	-
AP qsp	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Legenda: AM = azul de metileno. MP = Metilparabeno. PPG = propilenoglicol. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. AP = água purificada. qsp = quantidade suficiente para. FN = formulação com o polímero não-iônico. Fonte: própria autoria.

3.1.2 Formulações contendo CMC

As formulações contendo o polímero aniônico CMC, inicialmente o xilitol foi solubilizado em água e homogeneizado com quantidade apropriada da SEAM. Essa preparação foi dividida em três porções e em cada parte, o CMC foi dispersado na solução contendo o metilparabeno previamente solubilizado em propilenoglicol, seguindo as concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% do polímero. Em seguida, cada réplica foi dividida em duas porções, sendo adicionado, em apenas uma delas, o SDS previamente solubilizado em água purificada na proporção 1:10, obtendo ao total 6 preparações (Figura 5):

Figura 5 – Esquema de preparo das formulações partindo de uma mesma concentração de AM, contendo diferentes concentrações do polímero aniônico CMC, na presença ou ausência de SDS



Legenda: AM = azul de metileno. FA = formulação com o polímero aniônico. CMC = carboximetilcelulose. MP = Metilparabeno. PPG = propilenoglicol. SDS = dodecil sulfato de sódio. Fonte: própria autoria.

As formulações contendo polímero aniônico foram individualmente preparadas em triplicata, para as três diferentes concentrações do polímero CMC, contendo ou não o SDS, conforme esquematizado na Tabela 3:

Tabela 3 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações do polímero aniônico CMC

INSUMOS	FORMULAÇÕES								
	FA1			FA2			FA3		
	A/B/C	D/E/F	FA1Ø	A/B/C	D/E/F	FA2Ø	A/B/C	D/E/F	FA3Ø
AM	0,005%	0,005%	-	0,005%	0,005%	-	0,005%	0,005%	-
MP	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
PPG	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%
Xilitol	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
CMC	0,25%	0,25%	0,25%	0,5%	0,5%	0,5%	1%	1%	1%
SDS	-	0,25%	-	-	0,25%	-	-	0,25%	-
AP qsp	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Legenda: AM = azul de metileno. MP = Metilparabeno. PPG = propilenoglicol. CMC = carboximetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. AP = água purificada. qsp = quantidade suficiente para. FA = formulação com o polímero aniônico. Fonte: própria autoria.

Uma formulação base de cada concentração do polímero aniônico foi elaborada sem AM e sem SDS para ser utilizada como branco nos experimentos do espectrofotômetro, sendo nomeadas FA_Ø.

3.2 Avaliação espectroscópica da agregação (D/M)

A detecção dos estados de agregação (dímero e monômero) do AM foi realizada por técnica espectrofotométrica de absorção eletrônica na faixa de espectro eletromagnético UV-visível, a partir da relação entre os valores de absorção característica do FS para dímeros e para monômeros, seguindo metodologia padronizada por Junqueira et al. (2002).

O AM veiculado em formulação hidrofílica contendo polímero e adjuvantes, teve seus espectros de absorção registrados entre 250 e 800 nm em espectrofotômetro UV-visível UV-1800 (Shimadzu, Japão), usando uma cubeta de quartzo de 2 mm de caminho óptico.

A avaliação da agregação do AM nas formulações foi determinada pela razão D/M observadas as bandas de absorção obtidas nos espectros referentes aos dímeros e monômeros, sendo a sobreposição das bandas de absorção decompostas pelo método matemático de deconvolução, através da utilização do *software* OriginPro 2021, considerando a função gaussiana, com a finalidade de gerar dois picos deconvoluídos, identificando os picos de dímeros e de monômeros, separadamente.

Dessa forma, para as formulações contendo HPMC foram utilizados os comprimentos de onda de 614 e 662 nm, respectivamente para dímeros e monômeros. Para as formulações contendo CMC foram utilizados os comprimentos de onda de 623 e 663 nm, respectivamente para cálculo da razão D/M. O Quadro 3 sintetiza os grupos amostrais das formulações submetidas à avaliação espectroscópica da agregação e respectivos comprimentos de onda.

A análise estatística realizada através do *software* IBM SPSS Statics 22 avaliou os valores de D/M por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Por se tratar de dados não paramétricos, os mesmos estão sendo apresentados como mediana, mínimo e máximo. Para análise inferencial os valores de D/M

passaram por transformação logarítmica e foram analisados por meio do teste ANOVA uma via, seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

Quadro 3 – Composição dos grupos amostrais das formulações submetidas à avaliação espectroscópica da agregação e respectivos comprimentos de onda (λ)

AM	POLÍMERO e CONCENTRAÇÃO		SDS	AMOSTRAS			λ (nm)
0,005%	HPMC (Formulação Protótipo)	1%	–	PT1A	PT1B	PT1C	614 (D) 662 (M)
			0,25%	PT1D	PT1E	PT1F	
		3%	–	PT2A	PT2B	PT2C	
			0,25%	PT2D	PT2E	PT2F	
		5%	–	PT3A	PT3B	PT3C	
			0,25%	PT3D	PT3E	PT3F	
	HPMC (Formulação Não-Iônica)	1%	–	FN1A	FN 1B	FN1C	614 (D) 662 (M)
			0,25%	FN1D	FN1E	FN1F	
		3%	–	FN2A	FN2B	FN2C	
			0,25%	FN2D	FN2E	FN2F	
		5%	–	FN3A	FN3B	FN3C	
			0,25%	FN3D	FN3E	FN3F	
	CMC (Formulação Aniônica)	0,25%	–	FA1A	FA1B	FA1C	623 (D) 663 (M)
			0,25%	FA1D	FA1E	FA1F	
		0,5%	–	FA2A	FA2B	FA2C	
			0,25%	FA2D	FA2E	FA2F	
		1%	–	FA3A	FA3B	FA3C	
			0,25%	FA3D	FA3E	FA3F	

Legenda: AM = azul de metileno. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. PT = protótipo. FN = formulação com o polímero não-iônico. FA = formulação com o polímero aniônico. D = dímero. M = monômero. Fonte: própria autoria.

3.3 Determinação da viscosidade

A viscosidade expressa a resistência que a formulação líquida apresenta ao escoamento, sendo utilizado para sua determinação, um vibro viscosímetro de onda senoidal SV-10, no qual a viscosidade é medida através da detecção da corrente elétrica necessária para ressoar as duas placas do sensor a uma frequência constante de 30Hz e amplitude inferior a 1mm em volume de aproximadamente 40 mL de cada amostra, tendo sido o equipamento previamente calibrado com água purificada (A&D, 2024).

O valor apresentado como resultado de cada amostragem analisada foi dividido pela densidade específica da mesma amostra obtido em igual temperatura conforme apontado no item a seguir, para calcular o valor da viscosidade absoluta.

3.4 Determinação da densidade

A densidade representada pela razão da massa da formulação pelo seu volume foi calculada a partir da densidade relativa, cuja definição relaciona a massa da preparação e a massa de igual volume de água em mesma temperatura, tendo sido empregado um densímetro de concentração DMA 4500 M com cerca de 2 mL de cada amostra por análise (ANTON-PAAR, 2023).

Inicialmente a amostra foi injetada no equipamento com auxílio de seringa, sendo visualizado o completo preenchimento, sem presença de bolhas de ar. A temperatura é configurada para cada análise conforme mesmo valor obtido durante a análise de viscosidade, descrita no item anterior.

Entre as inserções de amostras, o tubo é limpo com acetona e injetado ar do próprio equipamento para total remoção e secagem.

O valor de densidade específica foi obtido pela divisão do resultado apresentado pelo valor da densidade da água em mesma temperatura, sendo esse o número empregado para o cálculo da viscosidade absoluta nos grupos amostrais detalhados no Quadro 4.

Quadro 4 – Composição dos grupos amostrais das formulações submetidas à determinação da viscosidade absoluta viscosidade e densidade

AM	POLÍMERO e CONCENTRAÇÃO		AMOSTRAS COM SDS 0,25%		
0,005%	**HPMC** (Formulação Não-Iônica)	1%	FN1D	FN1E	FN1F
		3%	FN2D	FN2E	FN2F
		5%	FN3D	FN3E	FN3F
	CMC (Formulação Aniônica)	0,25%	FA1D	FA1E	FA1F
		0,5%	FA2D	FA2E	FA2F
		1%	FA3D	FA3E	FA3F

Legenda: HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. FN = formulação com o polímero não-iônico. FA = formulação com o polímero aniônico. Fonte: própria autoria.

3.5 Determinação do pH

Definido como a medida da atividade do íon hidrogênio de uma solução, o valor do pH é obtido através da determinação potenciométrica em pHmetro utilizando eletrodo de vidro (BRASIL, 2019a).

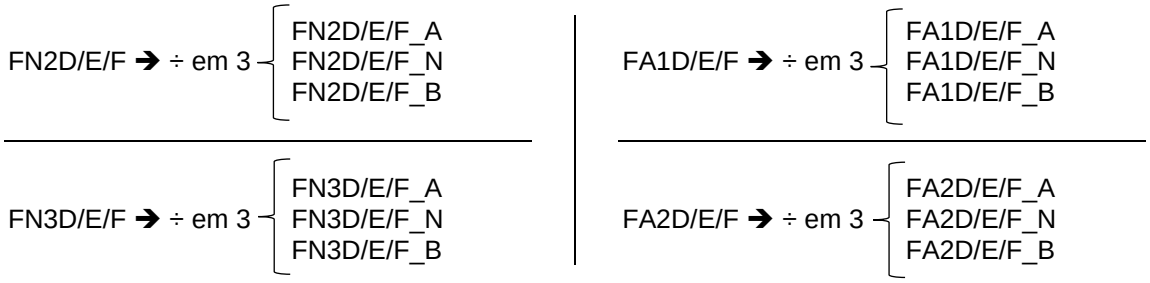
A determinação do pH foi realizada em cada amostra formulada, em triplicata, após calibração do equipamento com soluções tampão específicas mantendo a temperatura em 25 ºC.

Posteriormente a essa mensuração do pH das formulações iniciais de caráter neutro, foram feitos ajustes para acidificar e alcalinizar, com o intuito de avaliar a influência do pH na agregação, sendo realizada a avaliação espectroscópica para quantificar D/M, conforme o item 3.2 descrito anteriormente.

Para ajustar o pH das formulações selecionadas após análise da viscosidade, foram empregados agentes acidificantes ou alcalinizantes em quantidade suficiente (qs) para atingir o pH desejado (BRASIL, 2012), sendo utilizado solução de ácido clorídrico a 0,1 M e solução de hidróxido de sódio a 0,1 M, preparadas conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019a).

Com o intuito de manter as mesmas características de cada réplica, de cada uma das formulações contendo SDS (identificadas por D/E/F), foi obtida uma amostra em pH neutro, e outras duas em pH ácido e pH básico, conforme esquema demonstrado a seguir na Figura 6:

Figura 6 – Esquema de obtenção das formulações em pH ácido, neutro e básico, partindo de uma mesma amostra de cada preparação



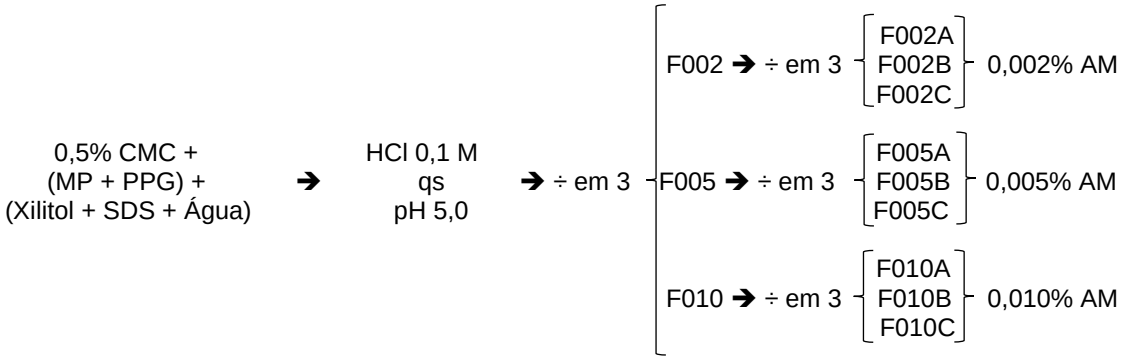
Legenda: FN2D/E/F = formulações com HPMC 3%. FN3D/E/F = formulações com HPMC 5%. FA1D/E/F = formulações com CMC 0,25%. FA2D/E/F = formulações com CMC 0,5%. _A = pH ácido ≈ 5,0. _N = pH neutro ≈ 6,5. _B = pH básico ≈ 8,0. Fonte: própria autoria.

Para análise estatística da influência do pH em cada concentração de polímero analisada, os valores de D/M obtidos foram avaliados por meio do *software* IBM SPSS Statics 22, resultando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk em dados não paramétricos, sendo apresentados como mediana, mínimo e máximo. Para análise inferencial, tais valores de D/M passaram por transformação logarítmica e foram analisados por meio do teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey, sendo adotado o nível de significância de 0,05.

3.6 Avaliação da concentração de AM na formulação selecionada

A formulação selecionada para realizar a avaliação espectroscópica da agregação em diferentes concentrações do FS foi preparada a partir da dispersão do CMC em solução contendo o metilparabeno previamente solubilizado em propilenoglicol. À parte, o xilitol e o SDS foram solubilizados em água purificada e essa solução foi vertida sobre o polímero. O ajuste de pH foi realizado com qs de solução de ácido clorídrico a 0,1 M para atingir o pH 5,0. Essa preparação foi dividida em três porções (para que fossem avaliadas 3 concentrações de AM), sendo cada uma delas novamente dividida em três partes para serem obtidas as triplicatas (identificadas por A/B/C). Em cada réplica foi adicionada quantidade apropriada da SEAM, seguindo as concentrações de 0,002%, 0,005% e 0,010% do AM, obtendo ao final, 9 preparações, conforme esquematizado na Figura 7:

Figura 7 – Esquema de preparo das formulações em diferentes concentrações de AM, partindo de uma mesma concentração de CMC na presença de SDS



Legenda: CMC = carboximetilcelulose. MP = Metilparabeno. PPG = propilenoglicol. SDS = dodecil sulfato de sódio. AM = azul de metileno. HCl = ácido clorídrico. qs = quantidade suficiente. F002 = formulação com 0,002% de AM. F005 = formulação com 0,005% de AM. F010 = formulação com 0,01% de AM. Fonte: própria autoria.

As formulações foram preparadas em triplicata, para as três diferentes concentrações do AM, conforme esquematizado na Tabela 4 e, então realizada a determinação da razão D/M de acordo com o item 3.2, descrito anteriormente, para avaliação espectroscópica da agregação.

Tabela 4 – Descrição quali-quantitativa das formulações contendo diferentes concentrações de AM com CMC e SDS

INSUMOS	FORMULAÇÕES		
	F002	**F005**	**F010**
	A/B/C	A/B/C	A/B/C
Azul de Metileno	0,002%	0,005%	0,010%
Metilparabeno	0,1%	0,1%	0,1%
Propilenoglicol	0,9%	0,9%	0,9%
Xilitol	5%	5%	5%
Carboximetilcelulose	0,5%	0,5%	0,5%
Dodecil sulfato de sódio	0,25%	0,25%	0,25%
Ácido clorídrico 0,1 M qs	pH 5,0	pH 5,0	pH 5,0
Água purificada qsp	100%	100%	100%

Legenda: qs = quantidade suficiente. qsp = quantidade suficiente para. Fonte: própria autoria.

3.7 Testes Microbiológicos

Foram realizadas avaliações *in vitro* de incorporação e viabilidade em biofilme de *Candida albicans.* Sendo, na etapa de incorporação, avaliados 2 grupos em 4 diferentes tempos, compostos por AM 0,005% em água (AM_A) ou em fórmula ácida de CMC (F_05) em 5, 10, 30 e 60 min.

Já na etapa de viabilidade, foram testados 6 grupos, sendo o controle (CT) composto por água; grupo fórmula sem AM (F_Ø); grupo AM a 0,005% em água (AM_05); grupo AM a 0,010% em água (AM_10); grupo fórmula com AM a 0,005% (F_05); grupo fórmula com AM a 0,010% (F_10), todos ajustados para pH 5,0 e com a descrição quali-quantitativa apresentada na Tabela 5.

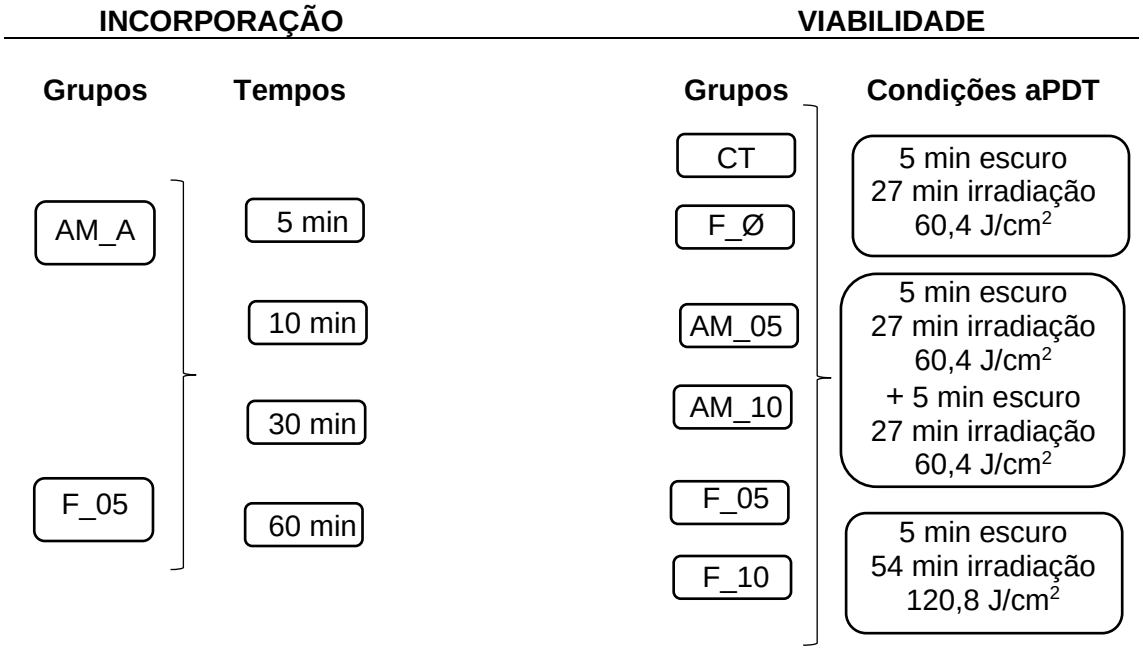
Tabela 5 – **Descrição quali-quantitativa dos grupos de formulações submetidos aos testes microbiológicos em biofilme de *C. albicans***

INSUMOS	GRUPOS						
	CT	**F_Ø**	**AM_A**	**AM_05**	**AM_10**	**F_05**	**F_10**
Azul de Metileno	-	-	0,005%	0,005%	0,010%	0,005%	0,010%
Metilparabeno	-	0,1%	-	-	-	0,1%	0,1%
Propilenoglicol	-	0,9%	-	-	-	0,9%	0,9%
Xilitol	-	5%	-	-	-	5%	5%
Carboximetilcelulose	-	0,5%	-	-	-	0,5%	0,5%
SDS	-	0,25%	-	-	-	0,25%	0,25%
HCl 0,1 M qs	pH 5,0	pH 5,0	-	pH 5,0	pH 5,0	pH 5,0	pH 5,0
Água purificada qsp	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Legenda: SDS = dodecil sulfato de sódio. HCl = ácido clorídrico. qs = quantidade suficiente. qsp = quantidade suficiente para. CT = controle em água pH ácido. F_Ø = fórmula sem AM. AM_A = AM 0,005% em água. AM_05 = AM 0,005% em água pH ácido. AM_10 = AM 0,010 em água pH ácido. F_05 = fórmula ácida com AM 0,005%. F_10 = fórmula ácida com AM 0,010%. Fonte: própria autoria.

Dessa forma, foi avaliada a incorporação em dois grupos ao longo de quatro diferentes tempos e foram testadas três diferentes condições de aPDT em seis grupos para avaliar a viabilidade. Os detalhes destes experimentos estão descritos posteriormente neste trabalho, mas podem ser observados resumidamente na Figura 8 a seguir:

Figura 8 – Resumo dos grupos e condições de aPDT avaliadas nos testes microbiológicos



Legenda: AM_A = AM 0,005% em água. F_05 = fórmula ácida com AM 0,005%. CT = controle em água pH ácido. F_Ø = fórmula sem AM. AM_05 = AM 0,005% em água pH ácido. AM_10 = AM 0,010 em água pH ácido. F_10 = fórmula ácida com AM 0,010%. Fonte: própria autoria.

3.7.1 Preparo do Biofilme

A levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) foi cultivada em meio ágar Sabouraud dextrose Kasvi (Curitiba, Brasil) a 37°C, por 24 horas. Os fungos foram recolhidos e transferidos para tubo contendo solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline;* pH = 7,2, 137 mol/L NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,47 mM KH_2PO_4 - Synth). Após a preparação da suspensão foi realizada a contagem para a certificação do número de células utilizando-se Câmara de Neubauer.

Para os ensaios de incorporação foram utilizadas microplacas de 24 poços, sendo adicionados 300 µL de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) Vitrocel (São Paulo, Brasil) aos poços por 24 horas. Em seguida, o FBS foi retirado e foi adicionada em cada um dos poços 600 µL de meio caldo Sabouraud dextrose Kasvi (Curitiba, Brasil) juntamente com 200 µL da suspensão de *C. albicans* (1,0 x 10^8 células/mL), incubando a 37°C sob agitação de 50 rpm durante 24h para formação do biofilme maduro.

Para os ensaios de viabilidade, a mesma metodologia descrita foi empregada, entretanto foram utilizadas microplacas de 48 poços com 200 µL de FBS, 300 µL de meio caldo Sabouraud dextrose e 200 µL da suspensão de *C. albicans* (5,0 x 10^7 células/mL) em cada poço, sendo incubado a 37º C sob agitação de 50 rpm por 24h e 48h para avaliação do biofilme em dois diferentes estágios, maturação e dispersão.

3.7.2 Avaliação *in vitro* de incorporação em biofilme de *Candida albicans*

Com o biofilme formado, o sobrenadante foi descartado e lavado com PBS. Em seguida, o biofilme foi tratado com 1.000 µL de AM a 0,005% veiculado em água deionizada estéril (AM_A) ou em formulação ácida de CMC 0,5% contendo 0,25% de SDS (F_05). O biofilme foi mantido por período variável de incubação no escuro. Após tempos de 5, 10, 30 e 60 min, 800 µL do conteúdo dos respectivos poços foi transferido para microtubos, sendo adicionados 40 µL de solução aquosa de SDS a 5% apenas às soluções AM_A, a fim de atingir a concentração de 0,25% de SDS, igualando às formulações. Em seguida todos os tubos foram centrifugados por 5 min a 5.000 rpm, equivalente à força centrífuga relativa 2,4 xg. O sobrenadante foi coletado e os espectros de absorção foram registrados entre 250 e 800 nm em espectrofotômetro UV-visível UV-1800 (Shimadzu, Japão), usando uma cubeta de quartzo de 2 mm de caminho óptico, com a finalidade de quantificar monômeros em comprimento de onda máximo de 663 nm. As análises foram feitas em triplicata e em dois experimentos independentes. Para determinação da incorporação, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Incorporação } (\%) = \frac{(Ci - Cf)}{Ci} . 100$$

Onde:

Ci = concentração inicial

Cf = concentração final registrada

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk apontou que os valores de % de incorporação eram não paramétricos. Dessa forma, os mesmos estão sendo apresentados como mediana, mínimo e máximo. Para análise inferencial os valores de D/M passaram por transformação logarítmica e foram analisados por meio do teste ANOVA duas vias, seguido do pós-teste de Tukey, com nível de significância de 0,05 através da utilização do *software* IBM SPSS Statics 22.

3.7.3 Avaliação *in vitro* de viabilidade em biofilme de *Candida albicans*

Com o biofilme formado, o sobrenadante foi descartado e lavado com PBS. Em seguida, o biofilme foi tratado com 200 µL das formulações de AM em concentração de 0,005% (F_05) e 0,010% (F_10), havendo poços mantidos como controle em água em pH ácido (CT), outros somente com a formulação base (F_Ø) além de poços tratados com AM em água, nas mesmas concentrações usadas nas formulações (AM_05 e AM_10). Após o tempo de incubação no escuro de 5 min, os tratamentos foram retirados e o biofilme passou por lavagem com PBS, sendo mantidos 300 µL de PBS em cada poço antes de ser irradiado em dispositivo LED (BioLambda, São Paulo, Brasil) com os parâmetros de comprimento de onda de 660 ± 10 nm, irradiância de 37,3 mW/cm^2, sendo avaliados em três diferentes condições de tempo: durante 27 min obtendo uma exposição radiante de 60,4 J/cm^2, com dupla aplicação de tratamento e irradiação de 27 min em cada ciclo ou durante 54 min direto obtendo uma exposição radiante de 120,8 J/cm^2 nas duas últimas situações. No duplo tratamento, passados os 27 min iniciais de iluminação, o PBS foi retirado dos poços e 200 µL de cada grupo de tratamento foi adicionado, mantidos por mais 5 min de incubação no escuro e retirados em seguida, sendo então levados novamente para irradiação com 300 µL de PBS em cada poço, por mais 27 min totalizando 54 min de iluminação. Ao término da irradiação o biofilme foi desfeito com agitação no Vórtex por 1 min e em seguida, 20 µL foi diluído em 180 µL de PBS. Posteriormente, foi retirada uma alíquota que passou por diluições seriadas

(10^{-1} a 10^{-5}) e 15 µL de cada diluição foi semeado na forma de uma linha em placa de Petri contendo o meio de cultura ágar Sabouraud dextrose Kasvi (Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas por 24h a 37°C, e o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), foi contado.

A análise estatística inferencial dos dados de Log UFC/mL para os experimentos com uma única irradiação (27 ou 54 min) e para o tratamento com 2 irradiações de 27 min cada, foram feitas por ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey, empregando o *software* IBM SPSS Statics 22. A fim de comparar os esquemas de tratamentos de dupla irradiação de 27 min cada e única irradiação de 54 min, foi realizada a análise inferencial por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo adotado o nível de significância de 0,05 para todas as análises de viabilidade.

3.8 Testes físico-químicos de estabilidade

A formulação veiculada em água, contendo CMC 0,5%, AM 0,005%, SDS 0,25%, Metilparabeno 0,1%, Propilenoglicol 0,9%, Xilitol 5% e qs de HCl 0,1 M para alcançar pH 5,0, teve sua estabilidade avaliada através de testes físico-químicos ao longo do período de 1 ano, em temperatura ambiente, conforme sua condição de armazenamento sugerida como um medicamento de base aquosa.

Os testes físico-químicos foram realizados de acordo com a metodologia farmacopeica (BRASIL, 2019a) determinando inicialmente o aspecto a partir das características organolépticas: aparência, cor e odor.

A determinação do pH foi realizada conforme descrito anteriormente no item 3.5.

A identificação da forma monomérica do AM foi realizada por análise espectrofotométrica, em comprimento de onda de 663 nm, cuja quantificação feita por absorção, relaciona a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância, conforme a lei de Beer em espectrofotômetro UV-visível.

Os valores de absorbância em 623 nm e 663 nm foram coletados de acordo com o já anteriormente descrito item 3.2 e utilizados para o cálculo da razão D/M a fim de avaliar a agregação do AM na formulação.

As avaliações e os registros foram realizados em triplicata e em três diferentes momentos ao longo de 1 ano: tempo inicial (TØ), 6 meses (T6) e 12 meses (T12).

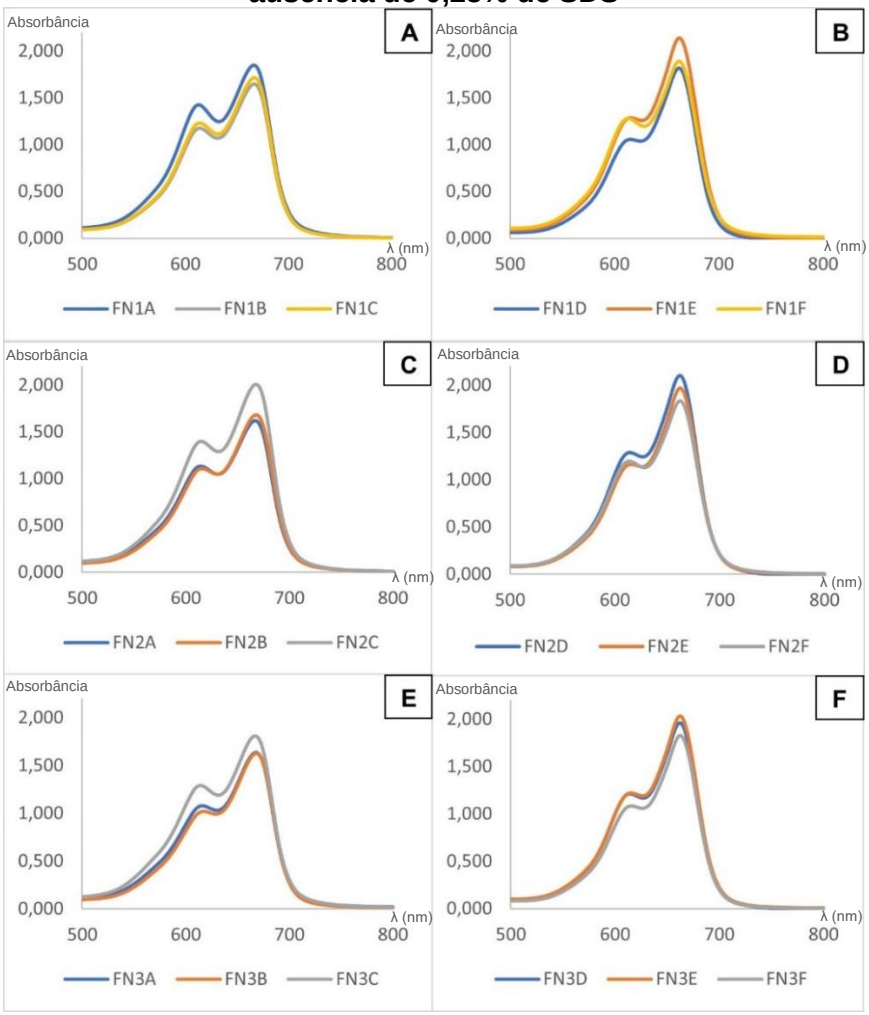
A análise dos dados de estabilidade da formulação através das medidas de pH, quantificação do monômero do AM e a razão D/M, demonstrou dados não paramétricos no teste de normalidade de Shapiro-Wilk realizado no *software* IBM SPSS Statics 22. Para análise inferencial, tais valores passaram por transformação logarítmica e foram analisados por meio do teste ANOVA uma via, seguido do pós-teste de Tukey, sendo adotado o nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Preparo das Formulações

Inicialmente foi realizado o preparo de um protótipo da formulação contendo o AM associado ao polímero não-iônico, edulcorante e surfactante, para avaliação da farmacotécnica de preparo e realizadas adaptações para padronizar os processos. Estes protótipos foram avaliados quanto à razão D/M e os espectros de absorção obtidos estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Espectros dos protótipos formulados com 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS

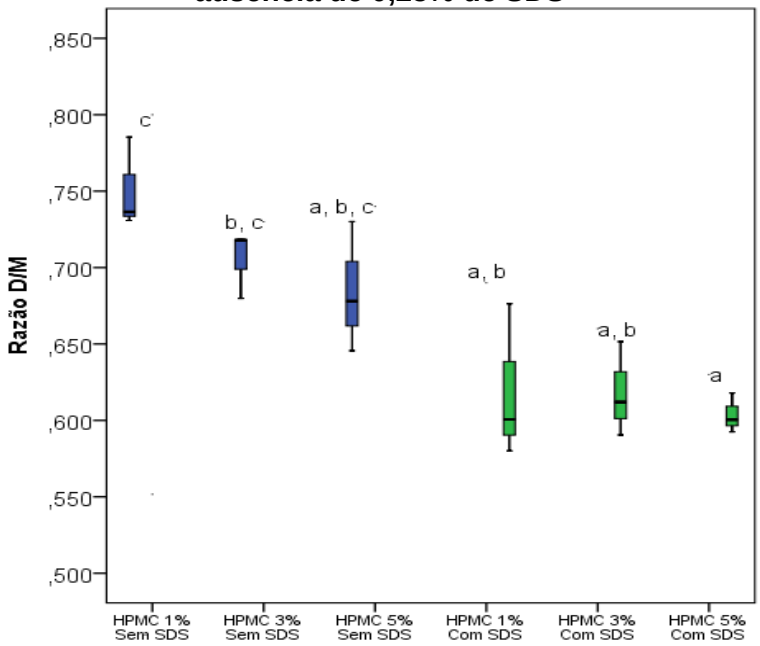


Legenda: A - amostras FN1A/B/C (HPMC a 1% sem SDS). B - amostras FN1D/E/F (HPMC a 1% com SDS). C - amostras FN2A/B/C (HPMC a 3% sem SDS). D - amostras FN2D/E/F (HPMC a 3% com SDS). E - amostras FN3A/B/C (HPMC a 5% sem SDS). F - amostras FN3D/E/F (HPMC a 5% com SDS). Fonte: própria autoria.

Apesar do posicionamento das bandas ser similar nas diferentes amostras de protótipos, é possível visualizar diferenças nas intensidades das bandas em uma triplicata. Uma vez que as formulações (dentro da triplicata) deveriam conter a mesma concentração de AM e do polímero, acredita-se que a farmacotécnica de preparo necessitaria de adaptação, de forma a uniformizar a quantidade de AM. Neste sentido, nas etapas seguintes partiu-se de uma mesma solução de AM para o preparo de todas as formulações, conforme metodologia adaptada.

A agregação do AM nas formulações preparadas conforme a farmacotécnica inicial para os protótipos feitos em três diferentes concentrações de HPMC, com e sem SDS, foi avaliada. A visualização desses dados dos protótipos avaliados está disponível na Figura 10.

Figura 10 – Razões (D/M)[a] dos protótipos contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS



[a]D/M = A_{614}/A_{662}. Legenda: D/M = dímero/monômero. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

Nas formulações sem tensoativo contendo AM a 0,005%, o valor da razão D/M encontrado na presença de HPMC 1% foi de 0,736 (0,731 – 0,785), passando a 0,718 (0,680 – 0,718) ao aumentar a concentração de HPMC para 3% e chegando a 0,678 (0,646 – 0,730) com HPMC 5%. Nas formulações contendo AM a 0,005% associado ao SDS a 0,25%, o valor da razão D/M

encontrado na presença de HPMC 1% foi de 0,601 (0,580 – 0,676), passando a 0,612 (0,590 – 0,652) ao aumentar a concentração de HPMC para 3% e chegando a 0,600 (0,592 – 0,618) com HPMC 5%. A análise estatística mostrou que não há diferença nos valores de D/M associadas ao aumento da concentração de polímero, tanto em presença quanto em ausência de SDS ($p > 0,05$). Porém, foi possível identificar redução significante nos valores de D/M da formulação HPMC 1% sem SDS em relação a todas as formulações com SDS: HPMC 1% e 3% ($p = 0,006$) e, HPMC 5% ($p = 0,002$). Além de HPMC 3% sem SDS em relação à HPMC 5% com SDS ($p = 0,0028$).

Neste sentido, acredita-se que a presença de SDS se faz essencial na formulação para controle da agregação do AM, bem como o aumento da concentração de polímero também parece desfavorecer a agregação do AM. Além disso, a variabilidade nos valores D/M na presença de SDS e 5% de HPMC foi menor.

Com base na análise dos espectros, optou-se por realizar ajustes à metodologia de preparo das formulações. O principal ajuste na metodologia de preparo e que, deve ser um ponto de atenção em estudos similares a este, bem como, em processos de produção de formulações de AM em pequena quantidade, foi a necessidade de produzir a SEAM padronizada a 1 mg/mL (0,1%) a partir da qual as formulações foram preparadas. Isso porque se trata de baixas concentrações do AM nas formulações finais, de modo que o preparo de pequenas quantidades de formulação à partir do corante em pó, leva à significativas variações de concentração do AM em diferentes lotes de produção de formulação. O método resultante destes ajustes foi descrito na metodologia do estudo, sendo que o mesmo foi utilizado tanto para preparo de formulações com HPMC quanto com CMC.

4.2 Determinação da razão D/M do AM nas formulações

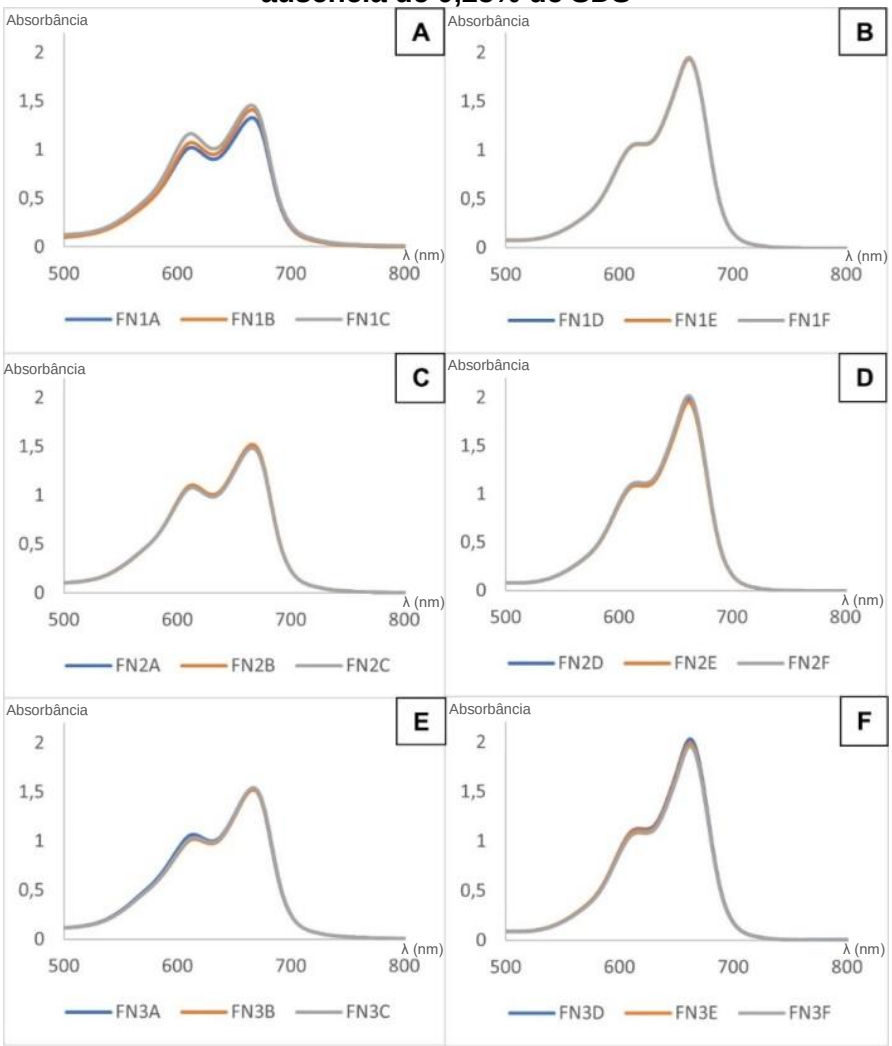
4.2.1 Formulações contendo o polímero HPMC

Foram refeitas as formulações aumentando a concentração de Xilitol para 5% de preparo e adotando nova farmacotécnica a fim de obter diferenças menos

relevantes na análise espectrofotométrica entre as réplicas formuladas individualmente.

As formulações obtidas por meio da metodologia final estabelecida resultaram em espectros de absorção das réplicas se sobrepondo, apontando que tal farmacotécnica conferiu maior reprodutibilidade no preparo das formulações e gerando uma melhor padronização na concentração de AM, conforme demonstrado na Figura 11.

Figura 11 – Espectros das formulações contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS

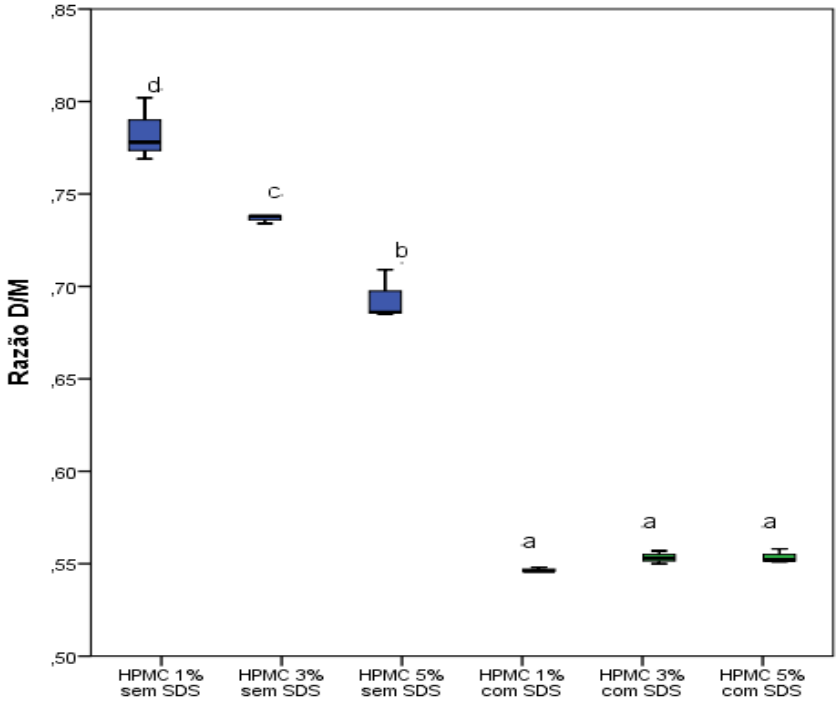


Legenda: A - amostras FN1A/B/C (HPMC a 1% sem SDS). B - amostras FN1D/E/F (HPMC a 1% com SDS). C - amostras FN2A/B/C (HPMC a 3% sem SDS). D - amostras FN2D/E/F (HPMC a 3% com SDS). E - amostras FN3A/B/C (HPMC a 5% sem SDS). F - amostras FN3D/E/F (HPMC a 5% com SDS).
Fonte: própria autoria.

Tal como para os protótipos, as bandas de absorção obtidas nesses espectros apontaram picos em 614 nm para dímeros e em 662 nm para

monômeros, cujos valores foram mantidos para cálculo da razão D/M, uma vez que matematicamente não foi possível ajustar adequadamente a deconvolução, de acordo com o gráfico gerado no Anexo C-1, no qual é possível visualizar que a curva permaneceu levemente deslocada. As razões D/M obtidas estão expostas na Figura 12.

Figura 12 – Razões (D/M)[a] das amostras contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS



[a]D/M = A_{614}/A_{662}. Legenda: D/M = dímero/monômero. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

A análise das formulações elaboradas pela farmacotécnica adaptada que teve o AM a 0,005% como ponto de partida, resultou nos seguintes valores da razão D/M nas preparações sem tensoativo: na presença de HPMC 1% foi de 0,778 (0,769 – 0,802), passando a 0,738 (0,734 – 0,738) na concentração de HPMC 3% e chegando a 0,686 (0,685 – 0,709) com HPMC 5%. Desta forma, conforme indicado pela análise estatística houve redução significativa nos valores D/M com o aumento da concentração de polímero na ausência de SDS.

Por outro lado, nas formulações contendo AM a 0,005% associado ao SDS a 0,25% os valores D/M foram significantemente menores que na ausência de SDS ($p < 0,001$). Além disso, na presença de SDS o aumento na

concentração de HPMC não causou diferenças significantes nos valores de D/M sendo 0,546 (0,546 – 0,548) para HPMC 1%, 0,553 (0,550 – 0,557) para HPMC 3% e 0,552 (0,551 – 0,558) para HPMC 5%.

Em ambas as técnicas obtivemos menores valores de agregação nas formulações contendo SDS ($p < 0,006$), sendo que o aumento da concentração do polímero não-iônico HPMC não influenciou no valor da razão D/M, ou seja, esse aumento de viscosidade não provoca diferença significativa da agregação do AM ao elevar a porcentagem do HPMC ($p > 0,05$). Além disso, com essa farmacotécnica adaptada a variabilidade entre os valores D/M também foi menor, indicando que as adaptações foram bem-sucedidas.

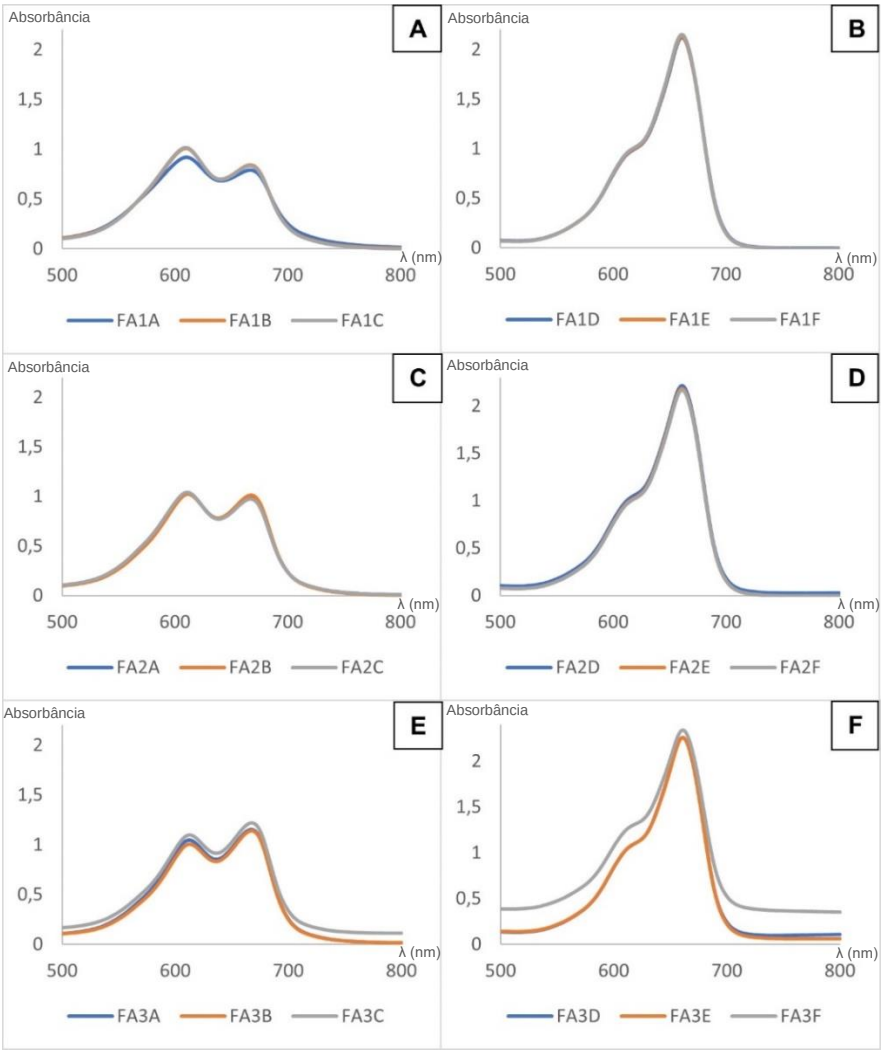
4.2.2 Formulações contendo o polímero CMC

Independentemente da concentração do polímero CMC empregado, os picos de monômeros apresentados nos espectros de absorção foram estáveis nas formulações com ou sem SDS, sendo respectivamente 661 nm e 667 nm. Já para dímeros foi observado que os picos aumentam gradativamente conforme a concentração do polímero aniônico é elevada na ausência do SDS, variando de 610 a 612 nm.

No entanto, na presença do surfactante não foi detectado um valor específico de pico para a forma agregada de AM, conforme as bandas de absorção que podem ser verificadas nos espectros demonstrados a seguir na Figura 13. Assim como observado anteriormente para o HPMC, os espectros de absorção das réplicas das formulações com CMC são bastante similares refletindo a reprodutibilidade no preparo das formulações em relação à concentração de AM.

Com base nestes espectros de absorção foram extraídos os valores para a determinação da agregação (D/M) e, para ter mais segurança foi optado por adotar os valores obtidos na deconvolução, visto que o gráfico gerado apresentou adequada sobreposição, conforme demonstrado no Anexo C-2, sendo adotados os valores de comprimentos de onda de absorção de 623 nm para dímeros e de 663 nm para monômeros, para o cálculo das razões D/M desse polímero.

Figura 13 – Espectros das formulações contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero aniônico CMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS

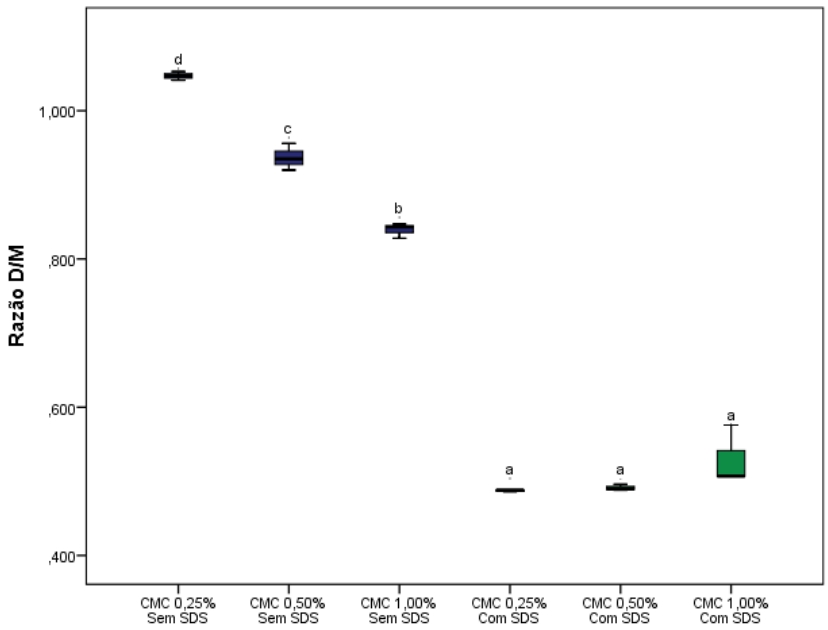


Legenda: A - amostras FA1A/B/C (CMC a 0,25% sem SDS). B - amostras FA1D/E/F (CMC a 0,25% com SDS). C - amostras FA2A/B/C (CMC a 0,5% sem SDS). D - amostras FA2D/E/F (CMC a 0,5% com SDS). E - amostras FA3A/B/C (CMC a 1% sem SDS). F - amostras FA3D/E/F (CMC a 1% com SDS). Fonte: própria autoria.

O valor da razão D/M em comprimentos de onda de 623 nm e 663 nm, respectivamente, nas formulações sem tensoativo contendo AM a 0,005% encontrado na presença de CMC 0,25% foi de 1,047 (1,041 – 1,053), havendo uma redução significativa e passando a 0,935 (0,920 – 0,956) ao aumentar a concentração de CMC para 0,5% e chegando a 0,843 (0,828 – 0,847) com CMC 1%. Por outro lado, nas formulações contendo AM a 0,005% associado ao SDS a 0,25%, o valor da razão D/M encontrado na presença de CMC não apresentou diferença significante com a variação de concentração do polímero, sendo 0,488 (0,486 – 0,488) a 0,25% de CMC, passando a 0,490 (0,488 – 0,496) ao aumentar

a concentração de CMC para 0,5% e chegando a 0,507 (0,507 – 0,576) com CMC 1%, conforme demonstrado no gráfico (Figura 14).

Figura 14– Razões (D/M)[a] das amostras contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero aniônico CMC, na presença ou ausência de 0,25% de SDS



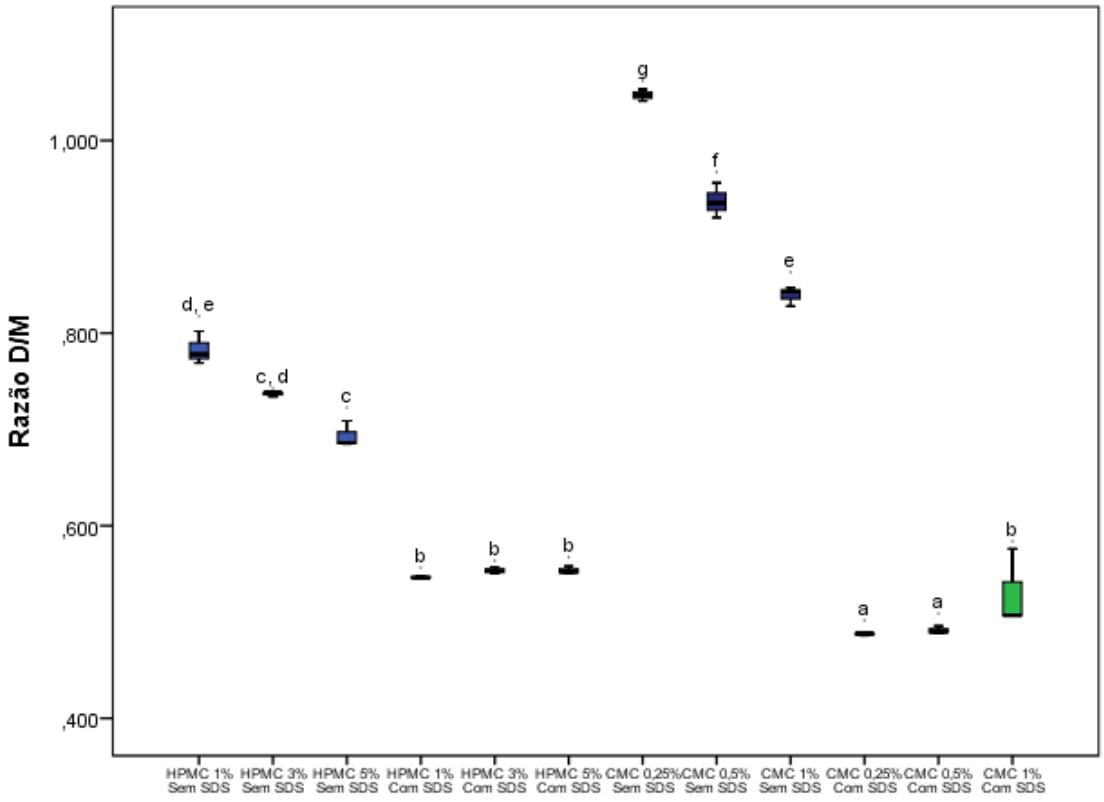
[a]D/M = A_{623}/A_{663}. Legenda: D/M = dímero/monômero. CMC = carboximetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

É possível observar que houve redução dos valores de D/M com o aumento da concentração do polímero CMC na ausência do SDS ($p < 0,05$), enquanto na presença do tensoativo, os valores se mantêm constantes conforme é aumentada a concentração do polímero aniônico. A presença de SDS nas formulações contendo qualquer concentração de CMC apresenta redução significante da razão D/M ($p < 0,001$). Diante desses resultados verificou-se a necessidade de associação do polímero CMC ao tensoativo SDS para que seja possível ajustar a viscosidade da formulação sem que haja efeitos significantes na agregação do AM.

Por fim, como os comportamentos frente à agregação são bastante similares entre os polímeros, optou-se por fazer um comparativo dos dados das razões D/M obtidas com as formulações utilizando os diferentes polímeros. Para isso, foi adotada a segunda farmacotécnica de preparo das formulações com o HPMC e os picos de dímero e monômero foram padronizados conforme

especificado anteriormente para cada polímero. O gráfico comparativo está apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Comparação das razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM veiculado em diferentes concentrações de polímero não-iônico (HPMC)[a] e aniônico (CMC)[b] na ausência ou presença de 0,25% de SDS



[a]$D/M_{(HPMC)} = A_{614}/A_{662}$. [b]$D/M_{(CMC)} = A_{623}/A_{663}$.

Legenda: D/M = dímero/monômero. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. CMC = carboximetilcelulose. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

Na ausência de SDS os valores de D/M são maiores em relação à presença de SDS, para ambos os polímeros estudados, em todas as concentrações de polímeros utilizadas. Isto é, observou-se que, independentemente do caráter iônico do polímero, foi obtida redução da razão D/M na presença do SDS ($p < 0,001$).

Nota-se também que na ausência do SDS, tanto na formulação com HPMC como CMC, houve redução dos valores de agregação com o aumento da concentração dos polímeros.

Os valores D/M na ausência de SDS são maiores na presença de CMC do que na presença de HPMC. Por outro lado, na presença de SDS os valores

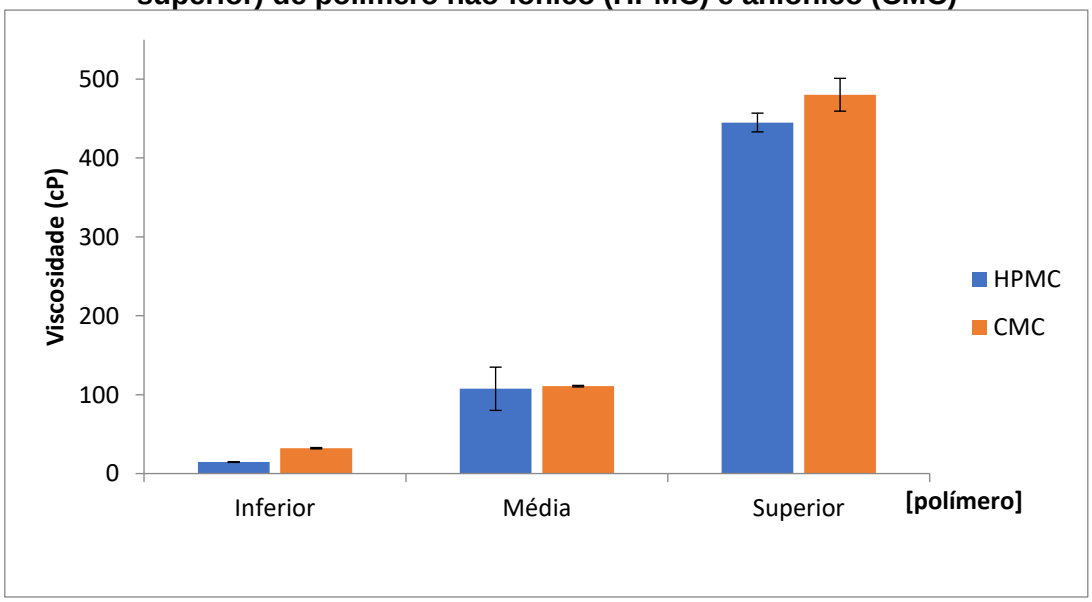
de D/M são menores na presença de CMC do que na presença de HPMC ($p < 0,05$).

No caso do CMC a 1%, no entanto, houve maior agregação em relação ao CMC 0,25% e 0,5% ficando equivalente aos valores obtidos para qualquer concentração do polímero HPMC na presença do tensoativo ($p = 0,507$).

4.3 Determinação da viscosidade e da densidade das Formulações

Partindo dos resultados da determinação da razão D/M do AM, optou-se por prosseguir as análises físico-químicas das preparações sempre formuladas na presença do surfactante, favorecendo dessa forma o controle da agregação do FS. A avaliação da viscosidade das formulações determinada por vibro viscosímetro e o cálculo da viscosidade absoluta a partir dos resultados obtidos da densidade específica, determinada com auxílio de densímetro de concentração, foi realizada nas mesmas três concentrações dos polímeros não-iônico ou aniônico (inferior, média e superior) das formulações contendo, AM a 0,005% e SDS a 0,25%, conforme valores apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Comparação das viscosidades (cP) das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações (inferior, média e superior) de polímero não-iônico (HPMC) e aniônico (CMC)

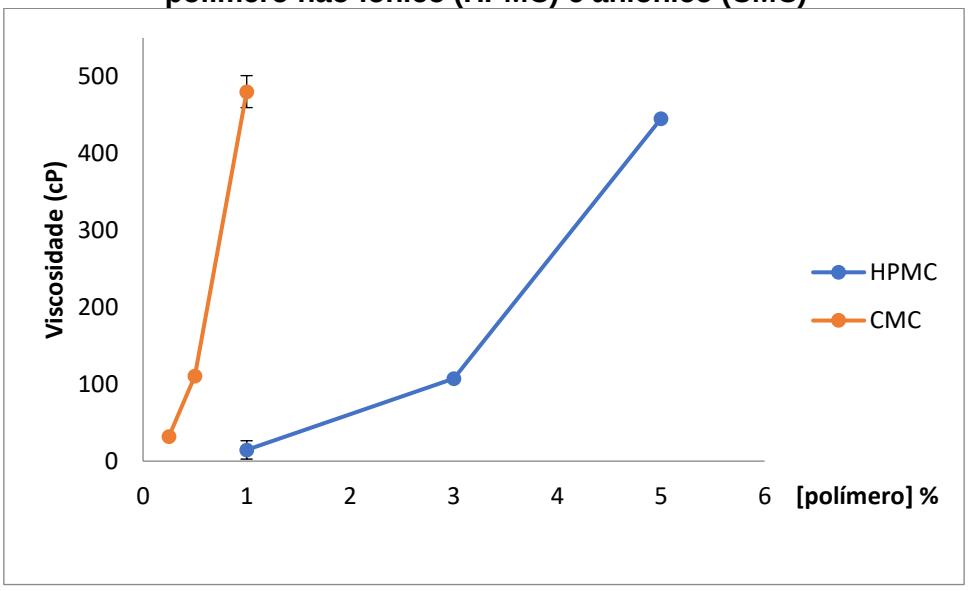


Legenda: AM = azul de metileno. SDS = dodecil sulfato de sódio. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose. Fonte: própria autoria.

Na presença de HPMC 1% o valor médio da viscosidade foi de 14,60±0,51 cP, passando a 107,50±27,43 cP ao aumentar a concentração de HPMC para 3% e chegando a 445,02±11,91 cP com HPMC 5%. Já na presença de CMC 0,25% foi de 32,12±0,85 cP, passando a 110,78±0,97 cP ao aumentar a concentração de CMC para 0,5% e chegando a 480,24±20,79 cP com CMC 1%.

É possível visualizar no gráfico exposto na Figura 17 que um pequeno aumento na concentração do polímero aniônico CMC causa um incremento pronunciado na viscosidade.

Figura 17 – Comparação das viscosidades (cP) das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados de acordo com as concentrações (%) de polímero não-iônico (HPMC) e aniônico (CMC)



Legenda: AM = azul de metileno. SDS = dodecil sulfato de sódio. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose.
Fonte: própria autoria.

Após análise da viscosidade foram escolhidas as quatro concentrações de polímeros que apresentaram formulações com valores entre 30 e 450 cP para prosseguir com as avaliações das razões D/M em variados valores de pH, sendo eliminadas as que apresentaram menor e maior viscosidade na avaliação geral. Permaneceram no estudo as formulações com o polímero não-iônico HPMC na concentração de 3% e 5%, identificadas por FN2 e FN3; e as formulações com o polímero aniônico CMC na concentração de 0,25% e 0,5%, identificadas por FA1 e FA2.

4.4 Determinação do pH das Formulações

A determinação do pH de todas as amostras contendo AM a 0,005% e SDS a 0,25%, nas três concentrações dos polímeros de caráter não-iônico e aniônico, foi realizada em pHmetro com eletrodo de vidro, obtendo os seguintes valores em cada formulação: HPMC 1% foi de 6,26 (6,12 – 6,28), HPMC 3% foi de 6,40 (6,31 – 6,46), HPMC 5% foi de 6,46 (6,37 – 6,47), CMC 0,25% foi de 6,63 (6,63 – 6,70), CMC 0,5% foi de 6,67 (6,57 – 6,70) e CMC 1% foi de 6,67 (6,67 – 6,72). Todas as formulações foram consideradas como de pH neutro com tais valores obtidos em torno de 6,5. Dessa forma, as preparações foram divididas em 3 porções conforme esquema apresentado em metodologia (Figura 6) para ajuste do pH e obtenção de amostras em pH ácido, neutro e básico, identificadas respectivamente pelos radicais _A, _N e _B, as quais foram submetidas à avaliação da influência do pH na razão D/M.

4.5 Determinação da razão D/M do AM nas formulações em função do pH

Os valores de pH das formulações, após ajuste em ácido, neutro e básico, estão descritos a seguir na Tabela 6:

Tabela 6 – Valores de pH das formulações em triplicata

FORMULAÇÕES	pH _Á (ácido)	pH _N (neutro)	pH _B (básico)
FN2 (HPMC 3%)	5,0 (4,9 – 5,2)	6,2 (6,1 – 6,2)	8,3 (8,3 – 8,4)
FN3 (HPMC 5%)	5,0 (4,8 – 5,0)	6,3 (6,2 – 6,3)	8,2 (8,1 – 8,3)
FA1 (CMC 0,25%)	5,3 (5,3 – 5,4)	6,8 (6,7 – 6,9)	8,4 (8,3 – 8,6)
FA2 (CMC 0,50%)	5,4 (5,2 – 5,4)	6,8 (6,7 – 6,9)	8,3 (8,1 – 8,4)

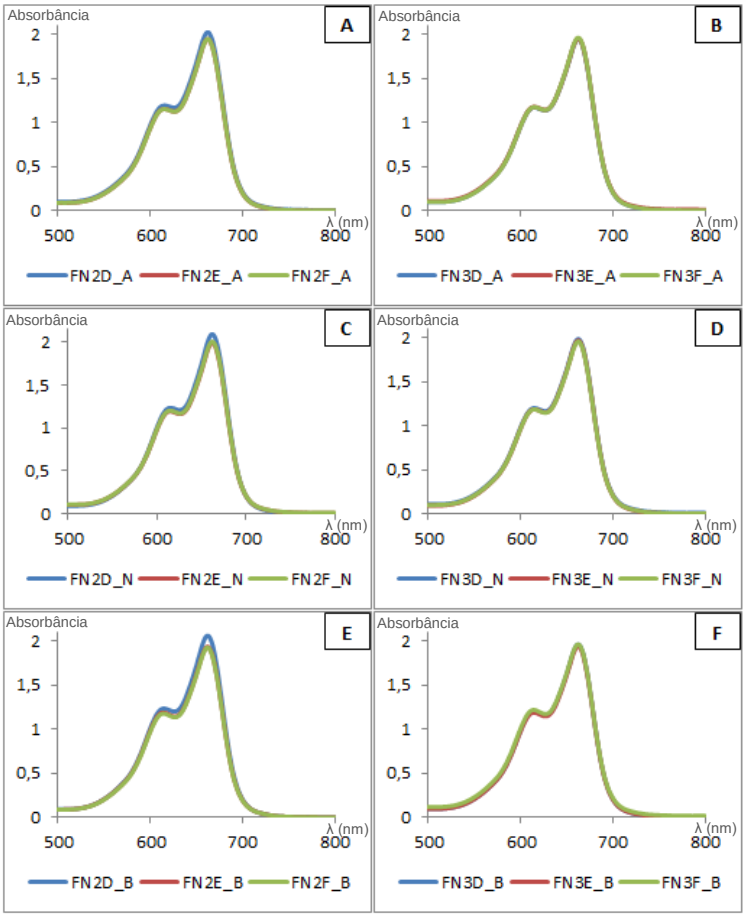
Legenda: HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose.
Fonte: própria autoria.

As réplicas das formulações de AM contendo SDS (D/E/F) com pH ajustados para ácido (_A), neutro (_N) e básico (_B), tiveram a agregação do AM avaliada por meio da análise espectrofotométrica, sendo determinada a razão D/M através dos valores das bandas de absorção especificadas para cada polímero, conforme dados apresentados no próximo item.

4.5.1 Formulações contendo o polímero não-iônico HPMC em pH variados

A agregação do AM foi avaliada nas formulações com SDS em duas diferentes concentrações de HPMC (3% e 5%), resultando nos seguintes espectros conforme demonstrado na Figura 18.

Figura 18 – Espectros das formulações contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, em pH ácido, neutro e básico



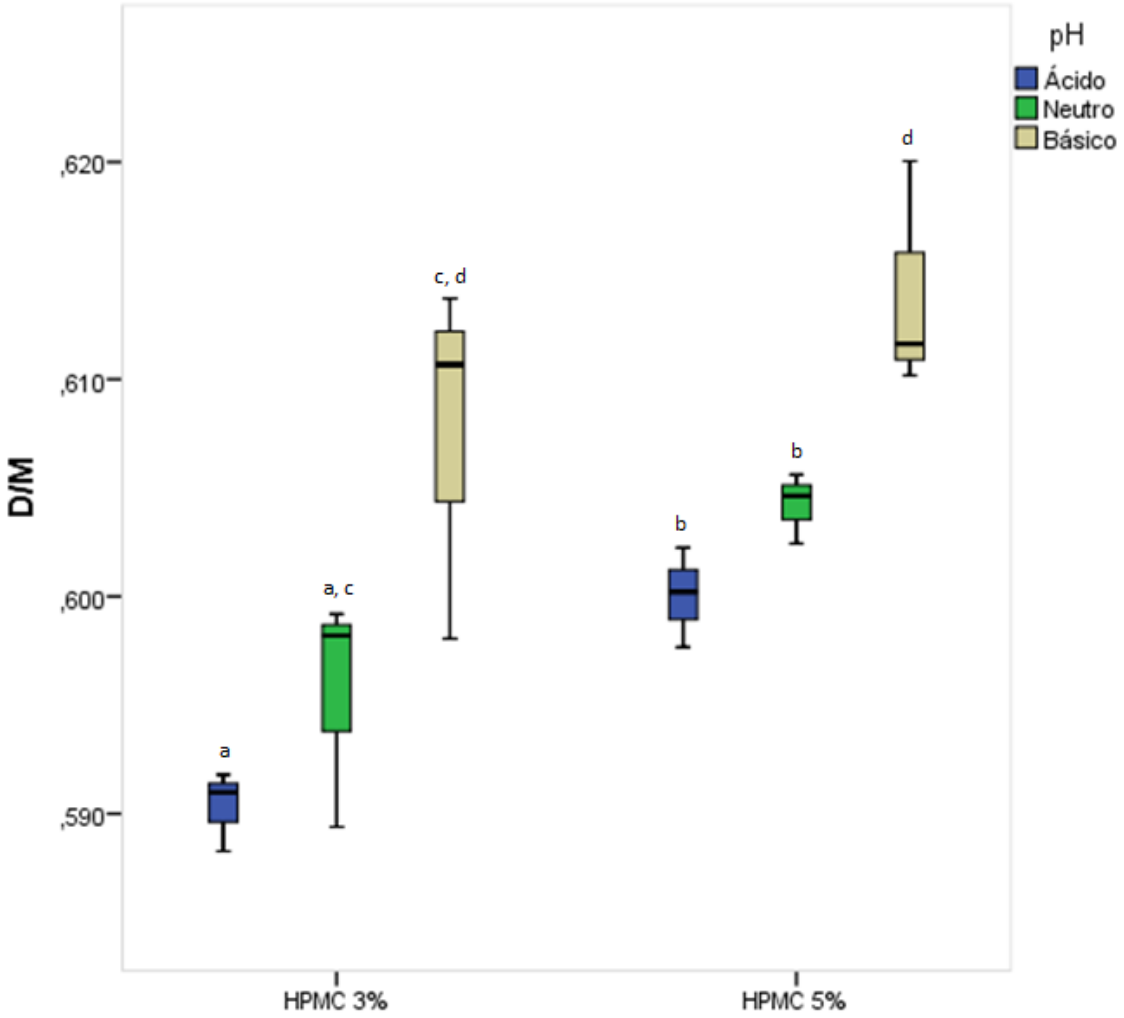
Legenda: A - amostras FN2D/E/F_A (HPMC a 3% pH ácido). B - amostras FN3D/E/F_A (HPMC a 5% pH ácido). C – amostras FN2D/E/F_N (HPMC a 3% pH neutro). D – amostras FN3D/E/F_N (HPMC a 5% pH neutro). E – amostras FN2D/E/F_B (HPMC a 3% pH básico). F – amostras FN3D/E/F_B (HPMC a 5% pH básico).
Fonte: própria autoria.

Os espectros de absorção obtidos das réplicas das formulações com HPMC em pH ácido, neutro e básico demonstram similaridade em relação à concentração do AM e a partir dos valores obtidos foi determinada a agregação do AM a 0,005% nas formulações com SDS a 0,25%.

Os valores de razão D/M em pH ácido foram de 0,590 (0,588 – 0,592) para HPMC 3% e de 0,600 (0,598 – 0,602) para HPMC 5%. Em pH neutro foram

de 0,596 (0,589 – 0,599) para HPMC 3% e de 0,604 (0,602 – 0,606) para HPMC 5%. E em pH básico foram de 0,607 (0,598 – 0,614) para HPMC 3% e de 0,614 (0,610 – 0,620) para HPMC 5%. O gráfico das razões D/M pode ser visualizado na Figura 19 a seguir.

Figura 19 – Razões (D/M)[a] das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero não-iônico HPMC, em pH ácido, neutro e básico



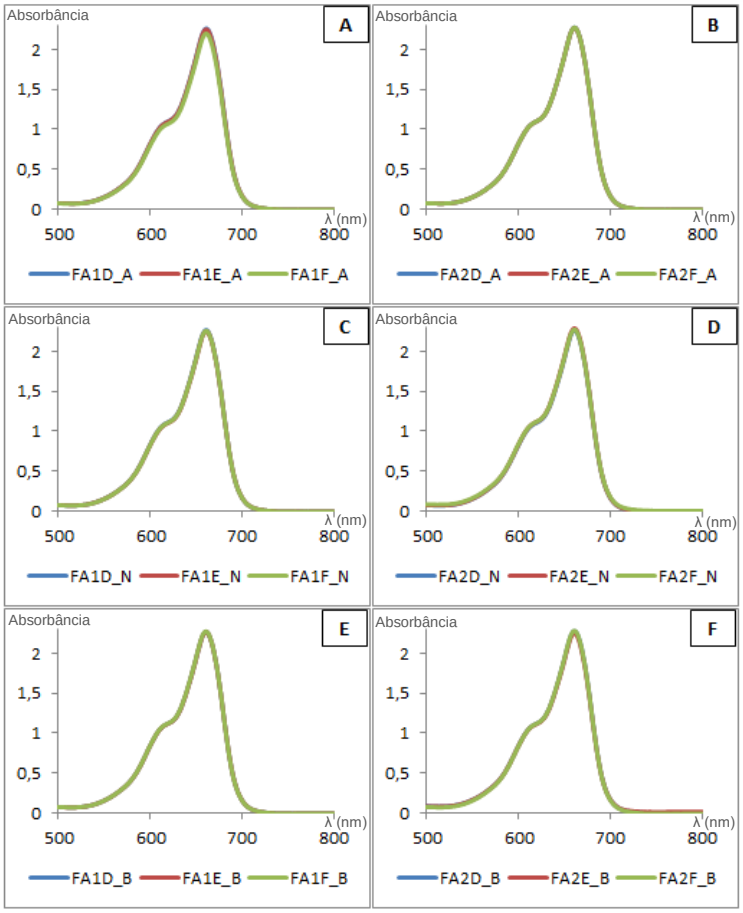
[a]D/M = A_{614}/A_{662}. Legenda: D/M = dímero/monômero. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

A razão D/M é significativamente menor na formulação de HPMC a 3%, em pH ácido e neutro. Tal como observado para o polímero em concentração a 5%, também não houve diferença significante na D/M entre o pH ácido e neutro. Porém, quando comparado ao pH básico, há diferença estatística em relação ao pH ácido que é significativamente menor em qualquer uma das duas concentrações analisadas.

4.5.2 Formulações contendo o polímero aniônico CMC em pH variados

A avaliação da agregação do AM foi realizada nas formulações com SDS em duas diferentes concentrações de CMC (0,25% e 0,5%), sendo os espectros apresentados na Figura 20.

Figura 20 – Espectros das formulações contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero aniônico CMC, em pH ácido, neutro e básico

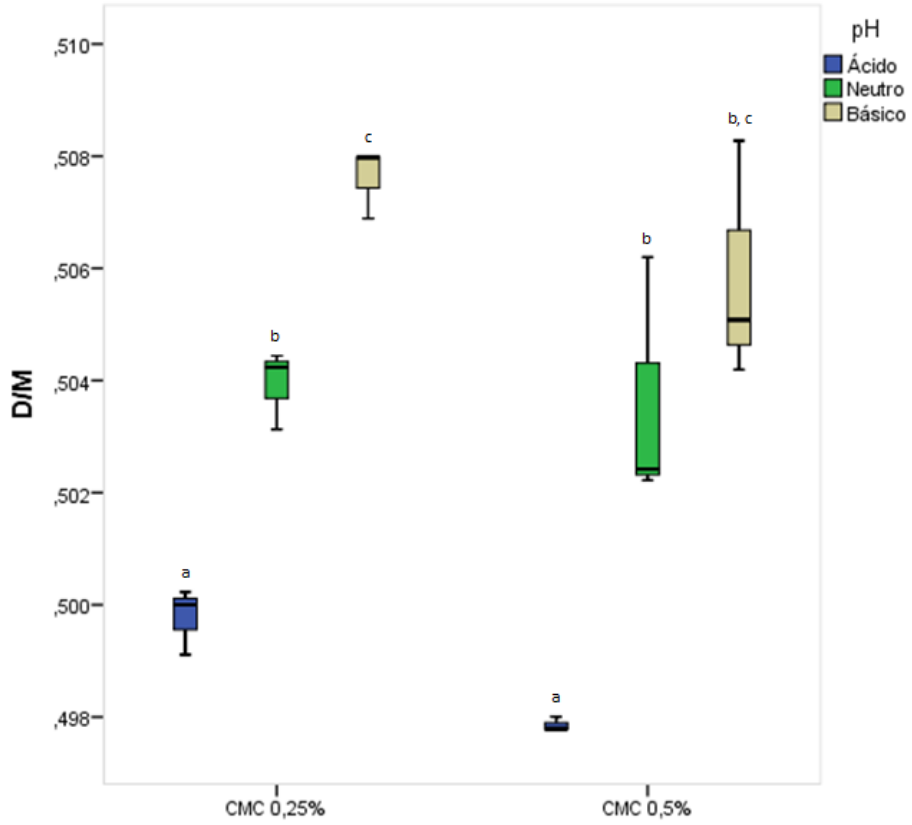


Legenda: A - amostras FA1D/E/F_A (CMC a 0,25% pH ácido). B - amostras FA2D/E/F_A (CMC a 0,5% pH ácido). C – amostras FA1D/E/F_N (CMC a 0,25% pH neutro). D – amostras FA2D/E/F_N (CMC a 0,5% pH neutro). E – amostras FA1D/E/F_B (CMC a 0,25% pH básico). F – amostras FA2D/E/F_B (CMC a 0,5% pH básico). Fonte: própria autoria.

Da mesma forma como observado nas formulações de HPMC, os espectros de absorção das réplicas das formulações com CMC em pH ácido, neutro e básico apresentam similaridade em termos dos comprimentos de onda dos máximos de absorção e em intensidade, sendo empregados os valores obtidos para determinação da agregação do AM a 0,005% nas formulações com SDS a 0,25%.

Em pH ácido, os valores de razão D/M considerando os valores dos máximos de absorção em 623 nm para dímeros e em 663 nm para monômeros foram de 0,500 (0,499 – 0,500) para CMC 0,25% e de 0,498 (0,498 - 0,498) para CMC 0,5%; em pH neutro foram de 0,504 (0,503 – 0,504) para CMC 0,25% e de 0,502 (0,502 - 0,506) para CMC 0,5% e em pH básico foram de 0,508 (0,507 – 0,508) para CMC 0,25% e de 0,505 (0,504 - 0,508) para CMC 0,5%. O gráfico representando esses dados está exposto na Figura 21.

Figura 21 – Razões (D/M)[a] das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero aniônico (CMC), em pH ácido, neutro e básico

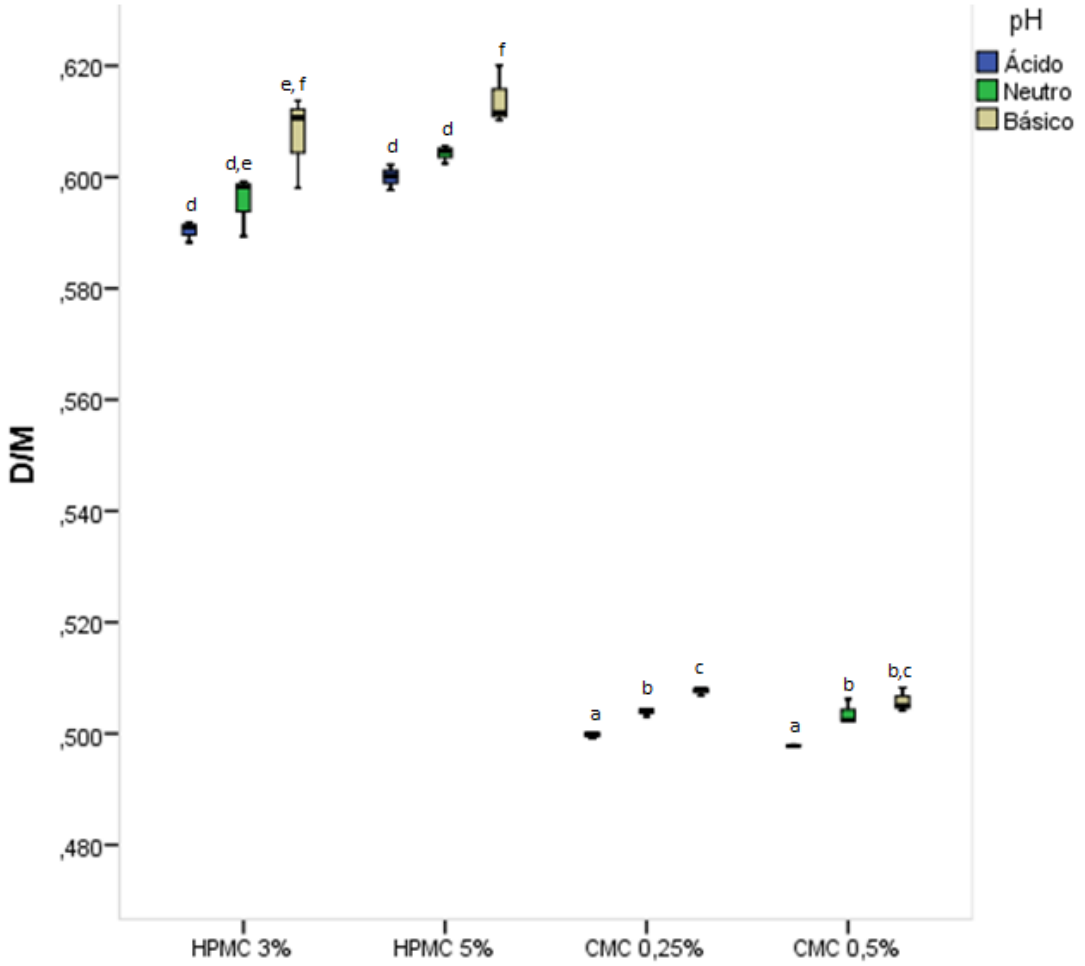


[a]D/M = A_{623}/A_{663}. Legenda: D/M = dímero/monômero. CMC = carboximetilcelulose. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

A variação da concentração do polímero aniônico CMC a 0,25% ou 0,5% não influencia na razão D/M em cada tipo de pH avaliado entre si. O pH ácido promove uma significativa redução da razão D/M comparativamente ao pH neutro e ao pH básico, nas formulações de CMC em qualquer concentração avaliada. A fórmula alcalina de CMC 0,5% não apresenta diferença significante em relação às formulações de pH neutro.

Ao analisar os dados de todos os polímeros e concentrações conjuntamente, nota-se que o CMC em qualquer concentração e em qualquer pH resulta em menor agregação do AM comparativamente ao HPMC, conforme apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Comparação das razões D/M das amostras contendo 0,005% de AM e 0,25% de SDS veiculados em diferentes concentrações de polímero não-iônico (HPMC)[a] e aniônico (CMC)[b], em pH ácido, neutro e básico



[a]$D/M_{(HPMC)} = A_{614}/A_{662}$. [b]$D/M_{(CMC)} = A_{623}/A_{663}$.
Legenda: D/M = dímero/monômero. HPMC = hidroxipropilmetilcelulose. CMC = carboximetilcelulose. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

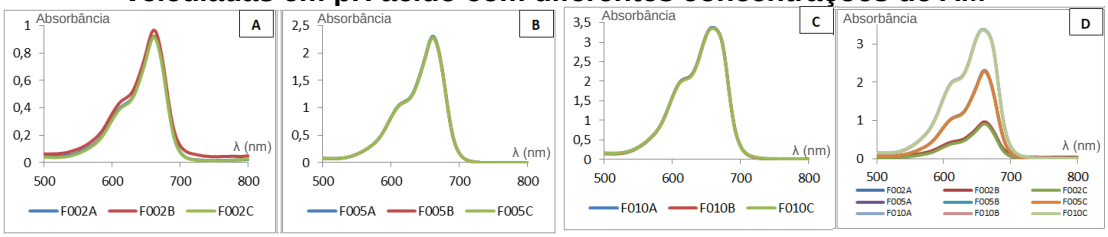
Interessante notar que nessa análise estatística inferencial conjunta a análise dos dados do CMC permanece inalterada, entretanto, a comparação entre as diferentes concentrações do HPMC, deixou de apresentar diferença significativa (como visto na Figura 19), passando a ser estatisticamente igual para 3% e 5% de HPMC em pH ácido e neutro. É possível visualizar que as razões D/M do HPMC são mais elevadas e apesar do CMC ácido apresentar

menores valores de D/M em relação as demais faixas de pH, os valores são numericamente muito próximos. Esse aspecto poderia ser considerado para determinar uma maior flexibilidade de pH de trabalho no desenvolvimento das formulações, no entanto, o fato da razão D/M ser igual em pH neutro e alcalino na concentração de 0,5% de CMC nos leva a considerar a concentração de 0,5% do CMC em pH ácido como melhor opção para prosseguir com os testes, uma vez que o pH em torno de 5 irá também proporcionar maior estabilidade à formulação evitando degradação por hidrólise em meio neutro a alcalino.

4.6 Determinação da razão D/M de diferentes concentrações do AM na formulação selecionada

Com base nos resultados anteriormente obtidos, foi selecionada a formulação com o polímero aniônico CMC em pH ácido e na concentração de 0,5%, uma vez que demonstrou menor agregação do AM tal como a concentração de 0,25%, sobretudo conferindo maior viscosidade como vantagem adicional. Dessa forma as formulações foram preparadas com diferentes concentrações de AM, de acordo com a descrição quali-quantitativa apresentada na Tabela 4 do item 3.6 da metodologia, sendo gerados os seguintes espectros apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Espectros das formulações contendo 0,5% de CMC e 0,25% de SDS veiculadas em pH ácido com diferentes concentrações de AM

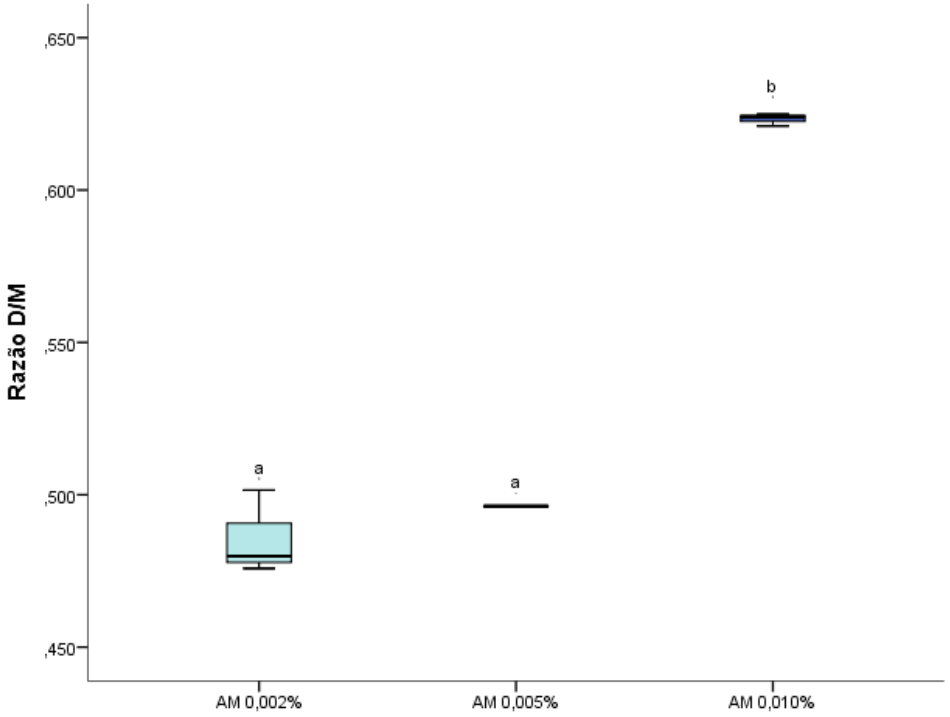


Legenda: A - amostras F002A/B/C (0,002% de AM). B - amostras F005A/B/C (0,005% de AM). C – amostras F010A/B/C (0,010% de AM). D – todas as amostras anteriores juntas. Fonte: própria autoria.

Os picos de dímeros e monômeros podem ser observados para cada concentração de AM avaliada, com similaridade entre as réplicas, sendo que a Figura 23-D demonstra a proporcionalidade dos espectros de todas as amostras juntas conforme a variação da porcentagem utilizada do FS. A razão D/M foi definida em comprimentos de onda de 623 nm e 663 nm, não apresentando

diferença estatística entre as duas menores concentrações avaliadas do FS, sendo encontrados os seguintes valores: 0,480 (0,476 – 0,502) para 0,002% de AM, 0,496 (0,496 – 0,496) para 0,005% de AM e 0,624 (0,621 – 0,625) para 0,010% de AM. O gráfico pode ser visto na Figura 24.

Figura 24 – Comparação das razões (D/M)[a] das amostras contendo 0,5% de CMC e 0,25% de SDS veiculados em pH ácido com diferentes concentrações de AM



[a]D/M = A_{623}/A_{663}. Legenda: D/M = dímero/monômero. CMC = carboximetilcelulose. SDS = dodecil sulfato de sódio. AM = azul de metileno. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

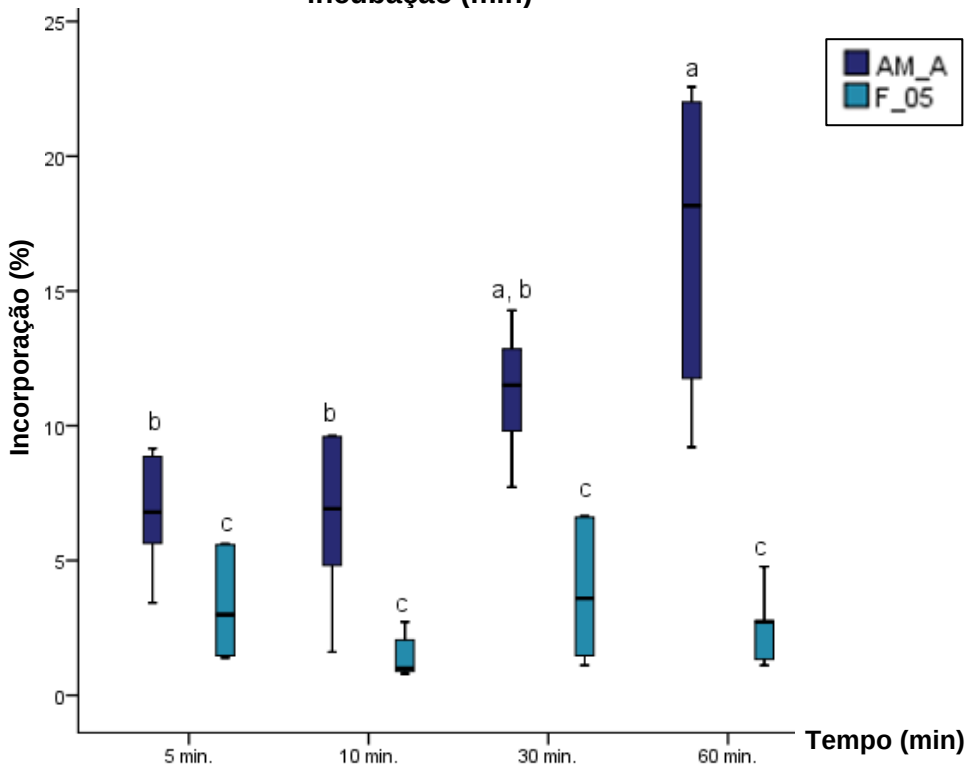
O aumento de concentração do FS na formulação demonstrou impactar na agregação do FS quando empregado 0,010% do AM, entretanto o mesmo não foi observado para a formulação de 0,005% que apesar de apresentar maior intensidade no espectro de absorção, a relação D/M se manteve equivalente à menor concentração avaliada de 0,002%.

4.7 Avaliação *in vitro* de incorporação em biofilme de *Candida albicans*

Os espectros registrados em triplicata e em dois experimentos independentes das amostras avaliadas conforme período variável de incubação no escuro em comprimento de onda máximo de 663 nm demonstraram em qualquer um dos tempos avaliados, maior taxa de incorporação para as preparações do AM em água comparativamente àquelas veiculadas em fórmula,

sendo a porcentagem ao longo do tempo nas preparações em água: 6,78% (3,43% – 9,16%) para 5 min; 6,92% (1,61% – 9,64%) para 10 min; 11,5% (7,73% – 14,3%) para 30 min; e, 18,2% (9,20% – 22,6%) para 60 min. A incorporação nas amostras veiculadas na formulação apresentou os seguintes resultados de acordo com os períodos de incubação no escuro: 2,99% (1,38% – 5,62%) para 5 min; 1,00% (0,803% – 2,72%) para 10 min; 3,59% (1,12% – 6,65%) para 30 min; e, 2,72% (1,12% – 4,78%) para 60 min, conforme exposto na Figura 25.

Figura 25 – Incorporação (%) em biofilme de *C. albicans* de amostras contendo AM 0,005% veiculado em água ou fórmula após período variável de tempo de incubação (min)



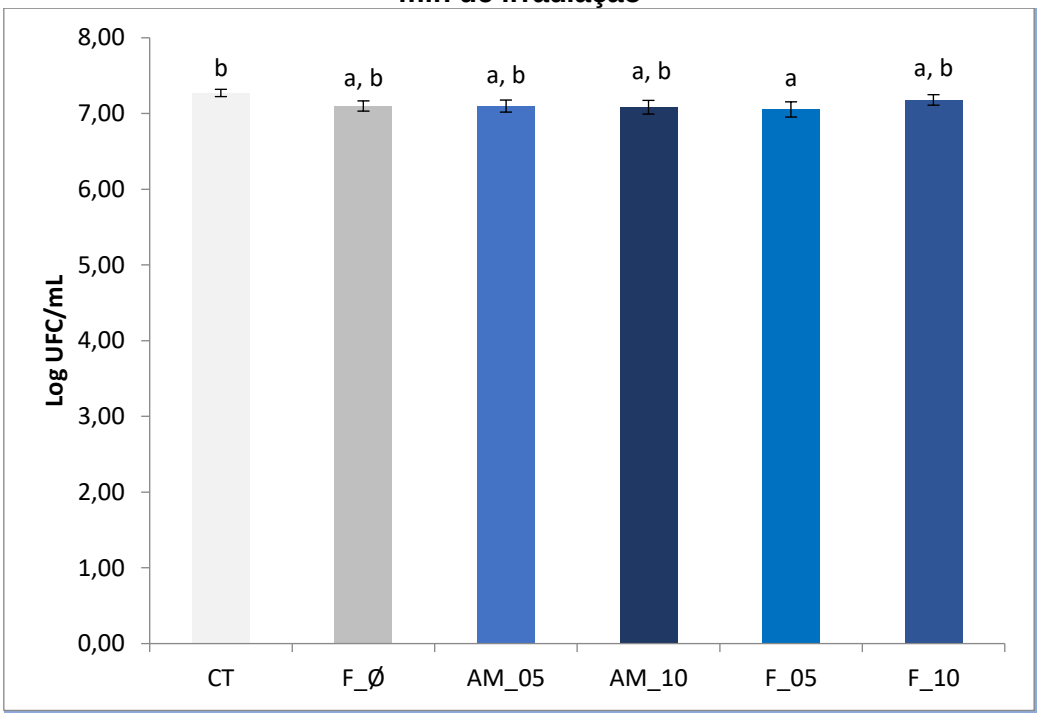
Legenda: AM_A = azul de metileno 0,005% em água deionizada estéril. F_05 = azul de metileno 0,005% em formulação ácida de CMC 0,5% contendo 0,25% de SDS.
Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si.
Fonte: própria autoria.

O AM veiculado em água apresenta maior incorporação comparativamente à formulação em qualquer um dos tempos analisados, sendo observada maior incorporação no maior tempo de incubação (aproximadamente 18%), sem diferença estatística entre 60 e 30 min, nem entre os períodos de 5, 10 e 30 min para amostras AM_A (incorporação por volta de 10%). Já para F_05 não houve diferença significativa entre qualquer um dos tempos analisados, sendo a incorporação de aproximadamente 3%.

4.8 Avaliação *in vitro* de viabilidade em biofilme de *Candida albicans*

Os tratamentos realizados em triplicata e em três experimentos independentes em biofilme de 24h com irradiação de 660 nm, 37,3 mW/cm^2, 60,4 J/cm^2 durante 27 min apresentou redução significativa na contagem de UFC/mL em relação ao CT apenas para o grupo F_05 (redução de 0,22 Log UFC/mL), sem diferenças estatísticas entre os demais grupos (Figura 26).

Figura 26 – Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 24h de *C. albicans* após 27 min de irradiação

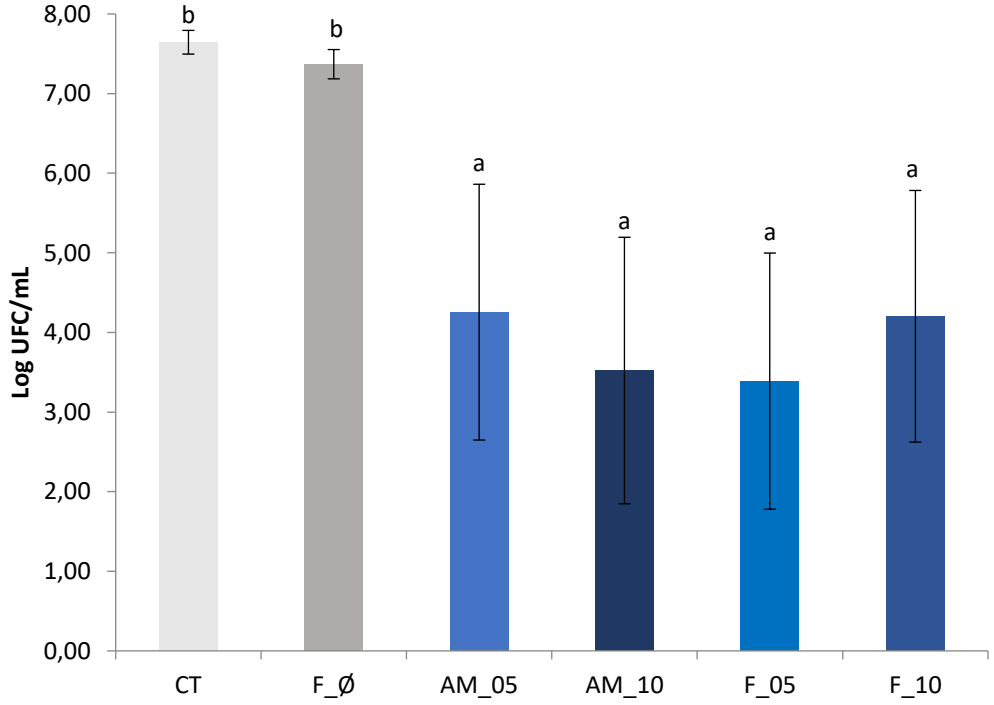


Legenda: CT = controle em água. F_Ø = formulação base. AM_05 = azul de metileno 0,005% em água. AM_10 = azul de metileno 0,010% em água. F_05 = azul de metileno 0,005% em fórmula. F_10 = azul de metileno 0,010% em fórmula. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

Com base em estudos prévios do grupo (MACHADO et al., 2023) optou-se por avaliar a viabilidade do biofilme de *C. albicans* em fase de dispersão após crescimento de 48h. Além disso, no trabalho mencionado o efeito antimicrobiano foi significativo quando foi realizado duplo tratamento, o que nos levou a optar por realizar neste estudo este mesmo procedimento: após a aplicação de um ciclo de PDT, realiza-se novo tratamento com o FS e repetição de irradiação por mais 27 min empregando os mesmos parâmetros de comprimento de onda de 660 nm, irradiância de 37,3 mW/cm^2 e alcançando uma exposição radiante de

120,8 J/cm^2. Diante do duplo tratamento foram obtidos os seguintes valores de redução de Log, em ordem crescente: 0,28 para F_Ø; 3,40 para AM_05; 3,45 para F_10; 4,13 para AM_10; e, a maior redução foi obtida com a F_05 sendo de 4,26 Log, sem diferenças estatísticas entre elas e com significativa queda em comparação aos grupos CT e F_Ø, os quais não apontaram diferença estatisticamente significativa entre si, de acordo com o demonstrado na Figura 27.

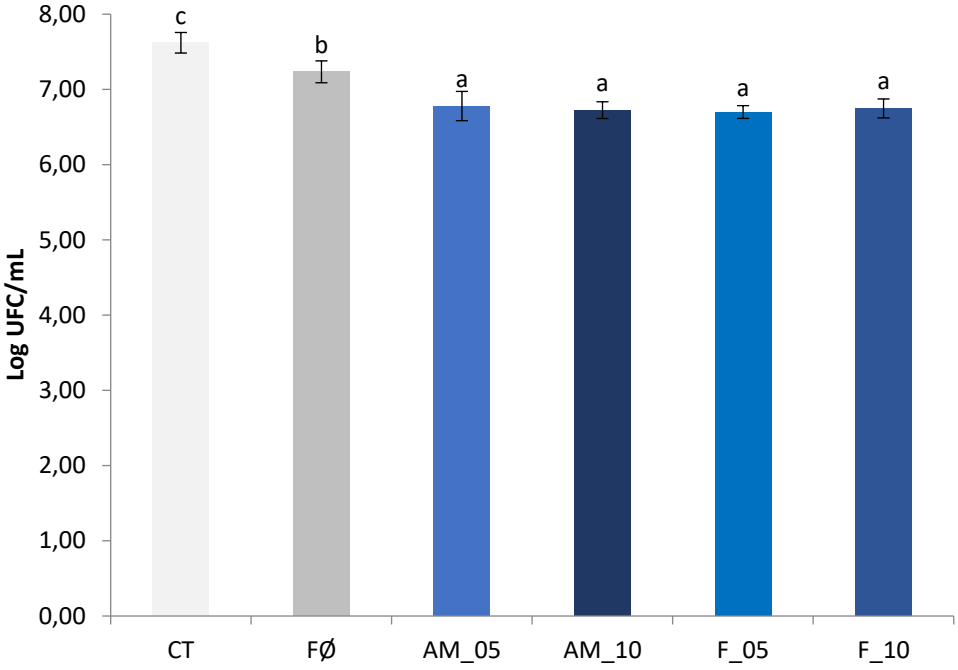
Figura 27 – Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 48h de *C. albicans* após 2 tratamentos de 27 min de irradiação cada



Legenda: CT = controle em água. F_Ø = formulação base. AM_05 = azul de metileno 0,005% em água. AM_10 = azul de metileno 0,010% em água. F_05 = azul de metileno 0,005% em fórmula. F_10 = azul de metileno 0,010% em fórmula. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

A fim de determinar se realmente são necessárias 2 aplicações do FS ou se somente aumentar o tempo de irradiação seria suficiente para alcançar o efeito antimicrobiano nas amostras com biofilme de 48h, o experimento também avaliou os tratamentos feitos com o dobro do tempo de irradiação, sem nova aplicação de FS, mantendo os demais parâmetros iguais. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 48h de *C. albicans* após 54 min de irradiação

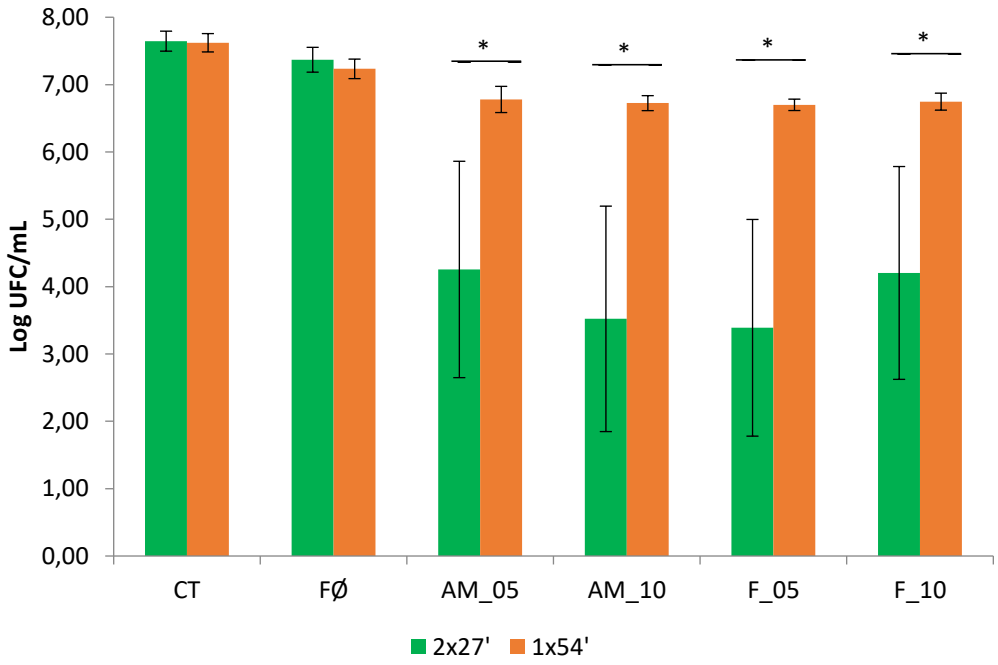


Legenda: CT = controle em água. F_Ø = formulação base. AM_05 = azul de metileno 0,005% em água. AM_10 = azul de metileno 0,010% em água. F_05 = azul de metileno 0,005% em fórmula. F_10 = azul de metileno 0,010% em fórmula. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

Com apenas 1 ciclo de irradiação de 54 min, sem reaplicação de tratamento, as reduções de Log foram significativas para todas as amostras comparativamente ao CT e todos os FS também em relação à F_Ø, porém com reduções máximas próximas a 1 Log UFC/mL. As reduções em ordem decrescente apontaram os seguintes valores: 0,92 para F_05; 0,90 para AM_10; 0,87 para F_10; 0,84 para AM_05, sem diferenças estatísticas entre elas; e 0,39 para F_Ø.

Na Figura 29 é possível visualizar a comparação entre os grupos que receberam 2 tratamentos de 27 min ou apenas 1 de 54 min, resultando em significativa diferença para todos os grupos contendo AM para o duplo tratamento sem ter sido observada diferença estatística entre os dois tipos de tratamentos executados nas amostras CT e F_Ø.

Figura 29 – Comparação Log UFC/mL Viabilidade em biofilme de 48h de *C. albicans* após 2 tratamentos de 27 min de irradiação ou apenas 1 de 54 min



Legenda: CT = controle em água. F_Ø = formulação base.
AM_05 = azul de metileno 0,005% em água. AM_10 = azul de metileno 0,010% em água.
F_05 = azul de metileno 0,005% em fórmula. F_10 = azul de metileno 0,010% em fórmula.
_*_ Grupos que apresentam diferenças significantes entre si em função do tempo de irradiação.
Fonte: própria autoria.

4.9 Estabilidade físico-química da formulação

A formulação selecionada no estudo, contendo 0,005% de AM, 0,25% de SDS veiculado em 0,5% de CMC teve sua estabilidade acompanhada a cada 6 meses por um período de 1 ano, sendo mantida em temperatura ambiente e acondicionada em sua embalagem, protegida da luz.

O aspecto da formulação foi determinado inicialmente como um gel fluido de coloração azul e odor característico, sendo tais características organolépticas da formulação mantidas inalteradas ao longo de todo período avaliado. Os demais atributos de pH, identificação do monômero do AM por espectrofotometria e razão D/M foram quantificados sendo registrados no tempo inicial (TØ), aos 6 meses (T6) e 12 meses (T12), conforme expostos os valores de mediana, mínimo e máximo na Tabela 7.

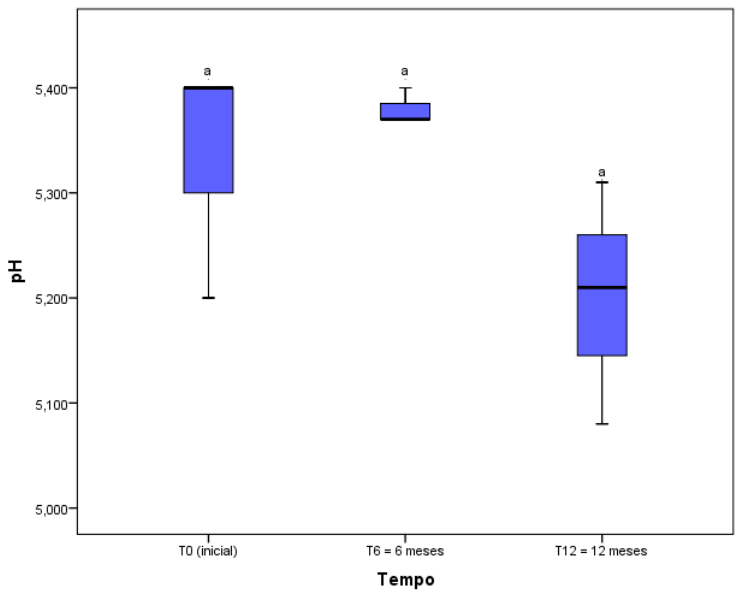
Tabela 7 – Mediana das triplicatas das análises físico-químicas de estabilidade

ATRIBUTOS	TØ	T6	T12
Características Organolépticas	Gel fluido azul de odor característico		
pH	5,40 (5,20 – 5,40)	5,37 (5,37 – 5,40)	5,21 (5,08 – 5,31)
Quantificação AM (A_{663} nm)	2,260 (2,257 – 2,260)	2,273 (2,269 – 2,295)	2,301 (2,228 – 2,362)
Razão D/M (A_{623}/A_{663})	0,498 (0,498 – 0,498)	0,496 (0,496 – 0,496)	0,502 (0,500 – 0,503)

Legenda: D/M = dímero/monômero.
Fonte: própria autoria.

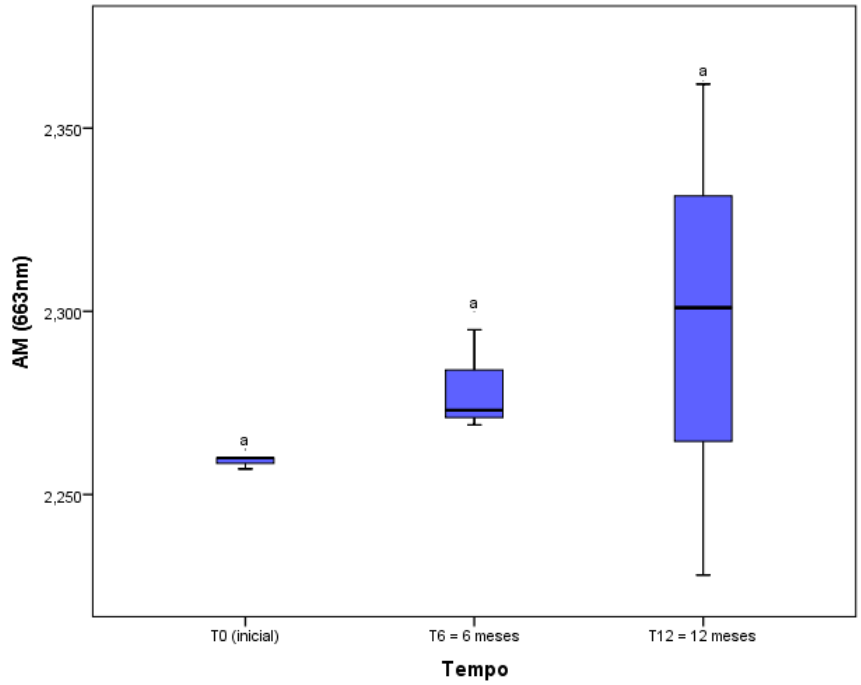
A formulação se manteve estável sem diferenças significativas ao longo do período avaliado nos quesitos pH (Figura 30) e absorbância do AM em 663 nm (Figura 31), entretanto, a elevação da razão D/M aos 12 meses foi considerada estatisticamente significativa, em relação aos outros dois tempos avaliados, demonstrando que há aumento da agregação do AM entre 6 meses e 1 ano (Figura 32). Apesar disso, a diferença numérica é bastante pequena (Tabela 7), o quê possivelmente não afetaria de forma considerável as características da formulação.

Figura 30 – pH da formulação ao longo de 12 meses



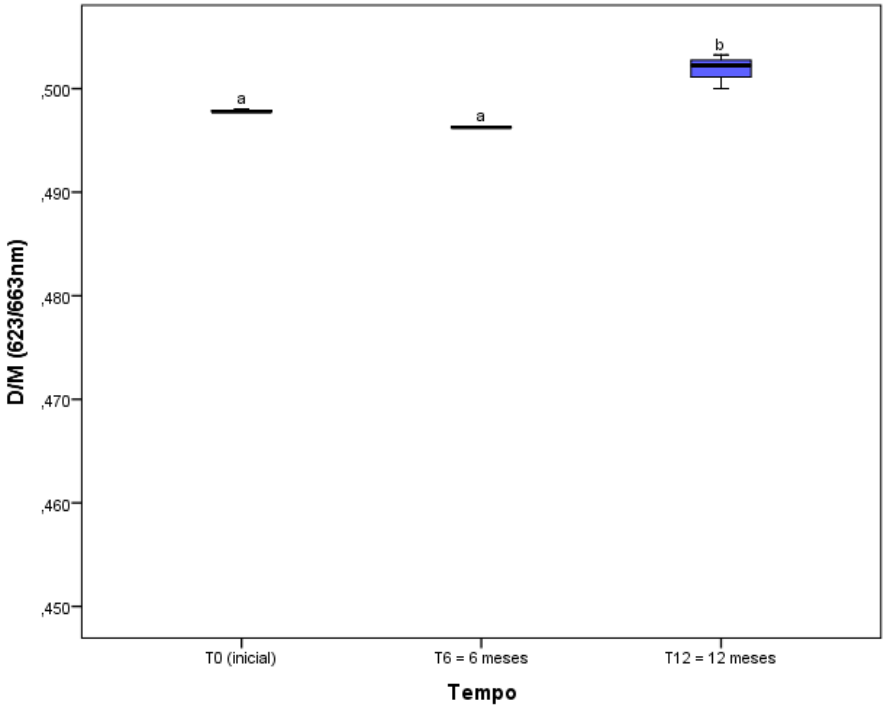
Legenda: Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si. Fonte: própria autoria.

Figura 31 – Detecção do monômero do AM na formulação em comprimento de onda de 663 nm ao longo de 12 meses



Legenda: AM = azul de metileno. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si.
Fonte: própria autoria.

Figura 32 – Razão D/M do AM na formulação em comprimentos de onda de 623/663 nm ao longo de 12 meses



Legenda: D/M = razão dímero/monômero. Grupos que compartilham a mesma letra não apresentam diferenças significantes entre si.
Fonte: própria autoria.

5 DISCUSSÃO

A aPDT é uma ferramenta bastante interessante no combate aos microrganismos devido à sua ação independente da resistência microbiana. Porém, alguns avanços se fazem necessários para a sua aplicação de forma mais assertiva. Na área da odontologia, os profissionais remetem à necessidade do fotossensibilizador permanecer por mais tempo no local de aplicação bem como, reduzir a diluição do FS em saliva, surgindo a necessidade de uma formulação mais viscosa. Paralelamente, o AM tem características físico-químicas e fotoquímicas específicas, havendo agregação dependendo do meio, além da modulação do mecanismo fotoquímico, sendo que se sugere que a presença de monômeros de AM apresentaria maior ação antimicrobiana por induzir o mecanismo do tipo II. Neste sentido, o intuito deste trabalho foi desenvolver uma formulação com AM para uso na aPDT na área da odontologia, procurando manter o AM em monômeros, em sua maioria, e dentro do possível aumentar a ação antimicrobiana.

Assim sendo, as formulações desenvolvidas por associação com polímeros poderiam afetar a agregação do AM, de modo que os espectros de absorção e a razão D/M foi avaliada em diferentes condições. Foram identificados leve deslocamento hipsocrômico na banda do monômero do AM com redução de apenas 1 nm para o CMC e 2 nm para o HPMC, permanecendo sem alteração ao considerar a faixa característica entre 660 e 665 nm (BERGMANN; O'KONSKI, 1963; HEGER; JIRKOVSK; KLA, 2005; KOSTJUKOVA; LEONTIEVA; KOSTJUKOV, 2021; SILVA et al., 2017). Santin et al. (2015) descrevem que há deslocamento batocrômico do monômero quando é utilizado solvente com polaridade mais elevada.

Já em relação à banda do dímero, a presença dos polímeros nas formulações favorece o deslocamento batocrômico do comprimento de onda máximo de absorção, deslocando de 590 nm quando o AM é veiculado em apenas água (COLLINA et al., 2018; SILVA et al., 2017) para 614 nm na presença do HPMC e para 623 nm na presença do CMC. Esse deslocamento também é observado em outros trabalhos nos quais se observa o máximo de absorção para dímeros em 600 nm (TANG et al., 2005) ou em 605 nm (BERGMANN; O'KONSKI, 1963; KOSTJUKOVA; LEONTIEVA; KOSTJUKOV,

2021). No entanto, quando o AM foi formulado em CMC na presença do surfactante não foi detectada a presença clara de uma banda de absorção do dímero. A presença do ombro em 610 nm corresponde à transição vibrônica de agregados do tipo H característicos da solução aquosa (BERGMANN; O'KONSKI, 1963; HEGER; JIRKOVSK; KLA, 2005), sendo confirmada a origem vibrônica desse ombro em ≈ 612 nm no espectro de absorção experimental (KOSTJUKOVA; LEONTIEVA; KOSTJUKOV, 2021) e considerado o dímero um agregado fortemente acoplado com estados excitados completamente mistos que alteram as propriedades espectroscópicas e fotofísicas da solução aquosa concentrada (DEAN et al., 2016). A veiculação em diferentes meios pode induzir formação de dímeros com distintas propriedades fotoquímicas devendo observar não só o estado de dimerização do FS como também o tipo de dímero formado (SEVERINO et al., 2003).

A elevação da concentração dos polímeros nas formulações sem SDS contribuiu para uma redução da agregação do AM, quando avaliadas entre si, podendo atribuir ao fato desses polímeros HPMC e CMC apresentarem propriedades emulsionantes e tensoativas além de serem agentes de viscosidade (ALLEN JR et al., 2012; THOMPSON; DAVIDOW, 2009). Entretanto, esses valores de razão D/M ficam acima dos observados para as formulações contendo o SDS indicando maior agregação do FS na ausência do surfactante. Apesar da redução observada nessa avaliação, os valores de D/M do AM em presença de SDS a 0,25% sem a presença de polímeros é de aproximadamente 0,22, enquanto na ausência de SDS em solução aquosa o AM a 0,005% apresenta razão D/M de 0,5 (COLLINA et al., 2018). Neste presente estudo, com adição do polímero aniônico CMC à formulação contendo SDS, a relação D/M obtida é dessa mesma ordem de 0,5. Para o HPMC associado ao SDS, o valor dessa razão apresenta-se por volta de 0,6. A maior formação de dímeros se dá em função de alterações no meio veiculado que proporcionam maior interação eletrostática e hidrofóbica entre as moléculas do AM (BERGMANN; O'KONSKI, 1963), cujo centro hidrofóbico desse FS catiônico é adequado para interações hidrofóbicas e eletrostáticas com o tensoativo aniônico (MUHAMMAD; KHAN, 2017).

Diante destes resultados iniciais, ficou clara a necessidade da incorporação do SDS como um agente de controle da agregação do AM nas

formulações independentemente do polímero avaliado. O processo de agregação do AM é característico no meio aquoso devido ao grande potencial de formação de ligações de hidrogênio (MOREIRA et al., 2010), sendo mais eficiente a dimerização em meio aquoso do que em micelas de SDS (SEVERINO et al., 2003). Nesse estudo pudemos notar essa expressiva diferença entre as formulações associadas ou não ao SDS. Na ausência do tensoativo a forma agregada do AM em dímeros esteve em maior quantidade que a monomérica, resultando em razão D/M superior a 1,0 ou muito próximo a isso nas formulações contendo o polímero CMC. Já com a adição do SDS nessas mesmas formulações houve prevalência da forma monomérica do AM, de forma que foi minimizado o processo de agregação do AM. A alteração das propriedades do AM associado ao tensoativo SDS se dá em decorrência das interações eletrostáticas que atraem o FS de caráter iônico oposto ao do surfactante, levando à formação de complexos micelares com predominância da forma monomérica (BRITO; SANTOS; NANTES-CARDOSO, 2019; COLLINA et al., 2018; JUNQUEIRA et al., 2002). A associação de AM ao SDS promove a formação de micelas e conversão dos dímeros em monômeros solubilizados no surfactante (MUHAMMAD; KHAN, 2017). A menor razão D/M do AM na presença de SDS é explicada pela maior dificuldade em haver dimerização devido a formação de pares de íons do FS e do surfactante e menor interação hidrofóbica entre duas moléculas do AM na região interfacial da micela (SEVERINO et al., 2003).

Em estudo realizado com goma arábica para obtenção de hidrogel, Vilsinski et al. (2021) atribuem a interação do AM com esse polímero aniônico às forças coulombianas, íon-dipolo, ligações H e hidrofóbicas. Os dados do polímero aniônico empregado nesta pesquisa em presença do SDS sugerem menor agregação do AM, o que poderia nos levar à escolha do CMC nessa etapa para dar sequência ao estudo. Porém como demonstrado na Figura 15, não houve diferença significativa na razão D/M na concentração de 1% de CMC comparada a qualquer concentração de HPMC nas formulações com o surfactante e, também foi constatado que na ausência de SDS a agregação do AM em CMC foi maior do que em HPMC, o que nos estimulou a prosseguir os experimentos com ambos os polímeros excluindo apenas uma das concentrações de cada nessa etapa.

Tanto o HPMC quanto o CMC são polímeros mucoadesivos com propriedades de bioadesão (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010), sendo adequados para o propósito de elevação da viscosidade da preparação destinada ao uso odontológico com maior permanência no local de aplicação. O HPMC a 2% em água possibilita obter formulações com viscosidade entre 80 e 120 cP a 20 ºC (SIGMA-ALDRICH, 2023b). A mesma concentração do CMC de média viscosidade proporciona preparações aquosas com viscosidade mais elevada, entre 400 e 800 cP em temperatura de 25 ºC (SIGMA-ALDRICH, 2023a), sendo possível obter formulações mais ou menos viscosas com maiores ou menores concentrações dos polímeros, tal como apresentado nessa pesquisa, na Figura 17.

Deste modo, em relação às concentrações dos polímeros, as formulações preparadas foram avaliadas em termos de viscosidade para escolha de duas concentrações de cada um deles para posterior análise nas diferentes faixas de pH. Assim, foram eliminadas do experimento a formulação de menor viscosidade (≈ 14,60 cP) do polímero não-iônico contendo 1% de HPMC, uma vez que se apresentou com baixa consistência e aparência muito líquida, não contribuindo para incremento suficiente de viscosidade a ponto de trazer benefícios clínicos no momento da aplicação em consultório odontológico; e, a formulação de maior viscosidade (≈ 480,24 cP) contendo 1% de CMC que, apesar de aparentar alta consistência, apresentou maior agregação do AM comparativamente às formulações de menor concentração do mesmo polímero e não apresentando diferença significativa quando comparado às amostras formuladas com o polímero não-iônico, conforme se observa na Figura 15.

A viscosidade tem sido contemplada na literatura odontológica como um parâmetro de referência aos biomateriais utilizados na prática clínica, sendo comumente expressa em classificações qualitativas de baixa, média ou alta viscosidade. Relaciona a fluidez do produto e sua capacidade de penetração e escoamento, sendo frequente atribuir o conceito de fluidez adequada para se adaptar aos tecidos bucais e viscosidade suficiente para ficar contido no local de aplicação (CATIRSE et al., 2020; VITO; ROMÃO JÚNIOR, 2022). A associação de substâncias antimicrobianas a polímero é uma técnica adotada para aumentar a substantividade e eficácia (SAKAE et al., 2018; TORRES et al., 2000), sendo desejável que a formulação contendo o FS tenha uma difusão

adequada para facilitar a penetração máxima nas estruturas anatômicas a serem desinfectadas e aumentar a incorporação do FS pelos microrganismos a serem tratados por aPDT (GEORGE; KISHEN, 2007). Para que o efeito antimicrobiano seja alcançado é fundamental que a substância apresente substantividade, com potencial de permanecer retida no local de ação sendo lentamente liberada a fim de evitar que seu efeito seja afetado pelo fluxo salivar (TORRES et al., 2000).

A análise da influência do pH indicou que as concentrações dos polímeros não-iônico e aniônico avaliados entre si nesse estudo não interferiram na razão D/M quando considerado cada tipo de pH isoladamente, de acordo com a Figura 22, ou seja, a viscosidade do polímero não afeta a agregação em função do pH. Entretanto, as formulações ácidas apresentaram menores valores de razão D/M. Ambas as concentrações do polímero não-iônico em pH ácido apresentaram menor razão D/M em relação às preparações formuladas em meio básico, sendo significativa a redução do valor de D/M em HPMC 3% e 5% ácida comparativamente às duas concentrações do HPMC em meio básico embora não haja diferença estatística com as mesmas formulações em pH neutro. Ainda assim, essas formulações apresentaram valores de razão D/M ainda altos, em torno de 0,6. Para a análise do polímero aniônico, o pH ácido também foi capaz de resultar numa significativa redução da razão D/M comparativamente ao pH básico e ao pH neutro, permanecendo na ordem de 0,5. Por ser catiônico, o AM em solução ácida, interage melhor com as moléculas aquosas do que materiais não protonados (VILSINSKI et al., 2021).

Ao comparar ambos os polímeros, HPMC e CMC, esse último demonstrou significativa redução da agregação do AM, em qualquer uma das concentrações avaliadas e em qualquer valor de pH, sendo o menor valor de razão D/M obtido com 0,5% de CMC em pH ácido com equivalência estatística à formulação também ácida de 0,25% de CMC, sendo ambos significativamente diferentes das demais faixas de pH. Vilsinski et al. (2021) observaram que o meio ácido leva a maior liberação do AM do hidrogel formado por polímero aniônico, após comparação de fluidos simulados em pH 1,2 e 6,8.

Nesse sentido, foi optada pela exclusão das formulações com o polímero não-iônico HPMC e também da formulação com o polímero aniônico CMC na menor concentração de 0,25%, uma vez que a formulação ficou mais fluida, tal

como a fórmula de HPMC 1% eliminada na fase anterior, cuja pouca consistência pode não contribuir sobremaneira para a viscosidade almejada.

Nessa etapa, o meio ácido foi considerado mais adequado para prosseguir com os experimentos, apesar de algumas publicações apontarem que o meio básico proporciona maior rendimento quântico de produção de $^1O_2$ (BONNEAU et al., 1975; CHEN; CESARIO; RENTZEPIS, 2011) e melhor efeito antimicrobiano (HUANG et al., 2019). Contudo, deve-se notar que a maior eficiência de formação de $^1O_2$ em pH alcalino relatada por Bonneau et al. (1975) foi determinada para soluções aeradas em saturação e fortemente tamponadas, o que não se aplica nesta pesquisa. Foi descrito pelos pesquisadores que soluções de AM na faixa de pH entre 5 e 6 fortemente tamponadas, apresentam rendimento da produção de $^1O_2$ cerca de 4 a 5 vezes menor quando comparadas ao pH básico. Já em soluções não tamponadas ou fracamente tamponadas, a extinção das espécies não protonadas de AM pelo O_2 é muito mais rápida do que a taxa de protonação para quaisquer valores de pH superiores a 5 e, portanto, o rendimento de $^1O_2$ seria semelhante àquele obtido em pH 8 (BONNEAU et al., 1975).

Em termos de desenvolvimento farmacotécnico de formulações, o pH ácido é preferível para elevar a estabilidade da preparação, reduzindo possibilidades de degradação, especialmente por hidrólise (FERREIRA, 2002). Segundo Luo et al. (2013), a acidez pode auxiliar a inativação bacteriana pela inibição da síntese de proteínas intracelulares. E de acordo com Gusman et al. (2018) o pH ácido da solução de AM apresenta maior biocompatibilidade com o tecido conjuntivo comparativamente ao pH neutro, favorecendo o reparo e a regeneração do tecido periodontal.

A formulação de CMC a 0,5% foi então preparada em meio ácido, com SDS a 0,25% e demais adjuvantes para ser associada a três diferentes concentrações de AM. Foi observada significativa diferença estatística na formulação de maior concentração (AM a 0,010%) com incremento da agregação na ordem de 0,62, o que talvez inviabilize o uso dessa porcentagem de FS na formulação. Já as duas menores concentrações de AM (0,002% e 0,005%) apresentaram menor agregação do FS, sem diferenças significantes entre si. A elevação da concentração do AM em solvente de alta constante dielétrica como a água favorece a dimerização modificando a repulsão

eletrostática entre os monômeros (LEWIS et al., 1943). À medida que a concentração do AM em solução aquosa aumenta, há mudanças no comprimento de onda máximo de absorção, passando de ≈ 660 nm para ≈ 600 nm, relacionada à formação de dímeros que são mantidos unidos pela ligação hidrofóbica que supera a repulsão eletrostática entre dois cátions do AM, levando à agregação (BERGMANN; O'KONSKI, 1963).

A concentração de 0,005% de AM foi selecionada para avaliar a incorporação em biofilme de *C. albicans*, resultando em maiores taxas para aquelas veiculadas em água em comparação à formulação. Vilsinski et al. (2021) afirmam que são baixos os teores de AM liberados dos hidrogéis em água, provavelmente devido à presença do polímero que ao proporcionar maior viscosidade à preparação favorece uma liberação modificada do FS (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). A incorporação é afetada pelo tipo e número de cargas do FS, grau de assimetria da estrutura molecular e grau de lipofilicidade (BACELLAR et al., 2015). A quimissorção desempenha um papel essencial na liberação do AM do hidrogel composto por polímero, a depender da capacidade de interação com a molécula do FS e de suportar maior conteúdo em sua estrutura, o que impede sua liberação devido significativas interações entre eles (VILSINSKI et al., 2021). Há, ainda, uma dependência significativa entre a densidade celular e a fotoinativação microbiana, implicando que há ligação ou interação das células com uma concentração limitada de algumas espécies e que isso ocorre independentemente de o FS ser ou não lavado em experimento realizado em suspensão. Esse efeito particularmente pronunciado em *C. albicans* sugere que o responsável pela morte dessas espécies é o $^1O_2$ extracelular ou outras ROS (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Em água, menores tempos de incubação resultaram em menor incorporação que pode ser justificado pelo sistema intrínseco de bomba de efluxo como mecanismo de defesa do microrganismo, capaz de reconhecer as moléculas de FS e afetar o transporte pela membrana (PRATES et al., 2011). Esse mecanismo de resistência a diversas drogas é muito conhecido em relação à espécie *C. albicans*, favorecendo a eliminação do FS através do bombeamento para fora das células e afetando a eficácia do tratamento (SILVA et al., 2017).

Foi relatado por Usacheva, Teichert e Biel (2003) que fenotiazínicos catiônicos adsorvidos na superfície da membrana celular de bactérias gram-

negativas formam dímeros ligados a biopolímeros aniônicos. Esta reação característica entre o polímero aniônico e FS catiônico resulta na formação de um complexo evidenciado por modificação no espectro e na razão D/M, com desenvolvimento de uma nova banda metacromática com desvio hipsocrômico, refletindo agregação ou empilhamento do FS ligado, sendo mais significativa a interação para o azul de toluidina comparativamente ao AM *in vitro* (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2003). O emprego de FS catiônico ou o uso de agentes que aumentam a permeabilidade na membrana externa de bactérias gram-negativas, elevam a eficácia em eliminar tais organismos (HAMBLIN; HASAN, 2004).

No presente estudo, a incorporação em água foi maior conforme tempo de incubação mais longo de 30 e 60 min. O tempo de pré-irradiação de 30 min foi considerado por Torres-Hurtado et al. (2019) mais efetivo para múltiplas aplicações de PDT em *C. albicans*. Por outro lado, em fórmula não houve influência dos tempos de pré-irradiação na incorporação de AM. Assim foram prosseguidos os testes de viabilidade empregando 5 min de pré-irradiação, que foi o menor tempo avaliado. Collina et al. (2018, 2020) também observaram que aumentar o tempo de pré-irradiação não modifica a resposta de aPDT ao utilizar solução aquosa de AM com SDS para esse mesmo microrganismo. O emprego desse tempo também foi considerado ideal tendo em vista o propósito de posteriormente estabelecer um protocolo para a clínica, na qual maiores períodos podem inviabilizar a adesão ao procedimento.

Nos experimentos de viabilidade foram alcançados resultados equivalentes entre formulação e preparação aquosa, demonstrando não haver impacto da menor incorporação na presença do polímero para efeito antimicrobiano na viabilidade, sendo similar a ação entre fórmula e solução, além do que na formulação tem o ganho na aplicabilidade devido a maior viscosidade. George e Kishen (2007) também observaram maior incorporação de AM veiculado em apenas água com menor taxa de morte celular associada, considerando que formulações diversas podem promover ligação do AM em diferentes locais, podendo resultar em elevação da concentração do FS no local com dimerização e consequente redução de morte celular, associada a menor rendimento quântico do $^1O_2$. Essa alteração de agregação do AM ocorre na mitocôndria formando dímeros que dependem tanto da concentração do FS como da própria organela, além do potencial de membrana que determina a

maneira que o AM se liga à mitocôndria (GABRIELLI et al., 2007). Alguns estudos apontam que os mecanismos do Tipo I, mesmo com menor rendimento quântico de $^1O_2$, apresentam maior eficiência em inativação fotodinâmica de bactérias, concluindo que os radicais de O_2 foram os principais responsáveis pela toxicidade dos FS examinados, devido à estrutura química do conjugado e a geração do radical hidroxila (HAMBLIN; HASAN, 2004). A quantidade de $^1O_2$ necessária para inativar uma célula de *C. albicans* é muito maior do que aquela necessária para o provocar o mesmo efeito em uma célula bacteriana devido a grande diferença de tamanho entre elas (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

A profundidade de penetração da luz, as características da cepa e do meio biológico a ser tratado são fatores que influenciam o efeito antifúngico do FS empregado na PDT, sendo o tempo de incubação fundamental para determinar a incorporação do FS nas estruturas celulares do microrganismo (LYON et al., 2011) como, por exemplo, em mitocôndrias como confirmado por Lam et al. (2011) em experimento com *C. albicans* planctônica. A interação do AM com as mitocôndrias leva a danos citotóxicos (GABRIELLI et al., 2007) estando relacionada à geração de $^1O_2$ (SEVERINO et al., 2003).

A formulação selecionada para prosseguir com os próximos testes poderia ser somente essa de concentração 0,005% de AM, no entanto, foi optado por testar a viabilidade em biofilme dessa concentração paralelamente a 0,010% de AM, uma vez que comercialmente existem produtos industrializados compostos pelo AM em água, com os nomes Chimiolux Gel 5 e Chimiolux Gel 10 (DMC Importação e Exportação de Equipamentos Ltda.), ambos registrados na ANVISA sob o nº 80030810168 com o nome técnico de evidenciador de placas na categoria de produtos para saúde. Importante mencionar que, diferentemente da formulação desenvolvida, tais produtos industrializados não apresentam SDS em suas composições.

Na avaliação *in vitro* de viabilidade em biofilme de *C. albicans* a fórmula base, sem AM (F_Ø) apresentou redução de 0,39 Log UFC/mL em relação ao controle somente no experimento de 54 min de irradiação direta, o que demonstra ausência de citotoxidade da formulação base desenvolvida. Esse pequeno efeito de redução nas UFC/mL pode ser atribuído à presença do SDS na formulação que vem demonstrando em trabalhos anteriores do grupo redução aproximada de apenas 1 Log UFC/mL comparativamente ao controle em água

quando empregada exposição radiante de 60,4 J/cm^2 e irradiância de 26,1 mW/cm^2 em suspensão de *C. albicans* (GONÇALVES et al., 2023) ou em biofilme do mesmo microrganismo em fase de aderência utilizando mesmo parâmetro de exposição radiante, porém por maior tempo alcançando a irradiância de 37,3 mW/cm^2 (MACHADO et al., 2023). A associação do SDS ao AM promove efeito antimicrobiano superior ao AM veiculado em água sem o surfactante (COLLINA et al., 2022), sendo alcançada inativação de *C. albicans* com parâmetros de irradiância a 26,1 mW/cm^2 e exposição radiante de 44 J/cm^2 em experimento realizado em suspensão (GONÇALVES et al., 2023).

A formulação contendo 0,005% de AM foi a única amostra analisada que demonstrou redução de UFC/mL significativa segundo a análise estatística no teste de viabilidade em biofilme com crescimento de 24h, porém o efeito foi pequeno com somente 0,2 Log UFC/mL de redução. Observação semelhante foi constatada por Machado et al. (2023) em amostras aquosas de diversos FS, incluindo AM, avaliadas em biofilme em fase de maturação, tanto na presença como na ausência de SDS.

Já na realização dos ensaios em biofilmes em fase de dispersão optou-se por realizar duplo tratamento de aPDT, visto que melhores efeitos antimicrobianos foram verificados em trabalhos anteriores do grupo utilizando este protocolo (MACHADO et al., 2023). Neste protocolo de duplo tratamento foi obtido efeito antimicrobiano de aproximadamente 4 Log de redução nas UFC/mL porém, todas as amostras contendo AM apresentaram efeito similar, independente da veiculação. Em experimentos de dupla aplicação de PDT *in vitro*, Nunes et al. (2023) obtiveram taxa de inibição de 99,991% de proliferação de *C. albicans*. O duplo tratamento não foi aplicado em biofilmes maduros nesta pesquisa, uma vez que trabalhos anteriores do grupo já constataram que não foi observada inativação do microrganismo nesse estágio (MACHADO et al., 2023).

Aplicações sucessivas de aPDT leva ao aumento da produção de ROS, provavelmente, devido ao acúmulo de metabólitos intracelulares que acentuam o estresse oxidativo sofrido pela célula fúngica levando a uma redução de UFC/mL (DIAS et al., 2023). Com o emprego de sucessivas irradiações é possível reduzir a densidade de energia luminosa e a quantidade de AM para inativar *C. albicans* (TORRES-HURTADO et al., 2019). O esquema de duas aplicações sucessivas de PDT é preferível uma vez que a elevação da irradiância

pode levar ao fotobranqueamento, diminuindo a eficácia antimicrobiana devido fotodegradação (MACHADO et al., 2023). Os espectros desta pesquisa não apontaram uma definição adequada da banda para quantificar a forma reduzida do AM, denominada leuco-AM, que é incolor e apresenta comprimento de onda de absorção máxima em torno de 256 nm em solução aquosa (IMPERT et al., 2003; LEE; MILLS, 2003) e 257 nm quando acidificada (MILLS; WANG, 1999), entretanto indica ser mais um fator interessante a ser examinado e que justifica a dupla aplicação com troca do FS.

Neste sentido, os dados obtidos corroboram com estes princípios visto que a aplicação única de 54 min de irradiação culminou em um efeito antimicrobiano de apenas 1 Log de redução nas UFC/mL, enquanto o duplo tratamento apresentou efeito antimicrobiano de 4 Log UFC/mL. A maior eficácia de inativação de UFC/mL está no dano incremental proporcionado às células a cada etapa de irradiação, uma vez que na primeira exposição à luz a célula pode sofrer poucos danos, e com mais uma ou duas irradiações será promovido maior dano impossibilitando mecanismos de auto-reparo (MELENDEZ-CELIS et al., 2021; TORRES-HURTADO et al., 2019). A matriz extracelular de células fúngicas com 48h de crescimento parece ser o primeiro alvo da aPDT (BAPTISTA et al., 2017).

Tal como afirmado por Machado et al. (2023) mantemos a hipótese que o duplo tratamento potencializou o efeito da aPDT na fase de dispersão do biofilme de *C. albicans* partindo da possibilidade da aplicação inicial ser capaz de sensibilizar o biofilme e provocar um leve rompimento da matriz extracelular com inativação de células dispersas de levedura e, com a segunda aplicação da PDT, alcançar uma penetração mais profunda do AM na célula, levando a um efeito antimicrobiano mais eficaz. Considerando ainda, que a aplicação na cavidade oral irá resultar na mistura do produto com saliva levando à diluição do FS e consequente redução do efeito da PDT, a dupla aplicação pode aumentar a ação antimicrobiana na prática clínica. Vale ressaltar a necessidade de explorar dosimetrias mais adequadas que viabilizem a futura aplicabilidade clínica e aderência ao tratamento pelo paciente, com menor tempo de irradiação e maior irradiância, controlando, no entanto, o fotobranqueamento.

Apesar da maior incorporação apresentada pelas preparações aquosas sem a presença do polímero CMC, as amostras veiculadas na formulação

apresentaram significativos resultados no ensaio de viabilidade, sem prejuízo da ação antimicrobiana, culminando em ganho clínico pela elevação da viscosidade. Estes resultados sugerem que a presença do polímero pode retardar a liberação do FS ao meio contendo as células, no entanto essa menor quantidade incorporada foi capaz de manter uma bioadesão e proporcionar uma maior interação provocando inativação celular com redução de até 4,26 Log UFC/mL para a concentração de 0,005% de AM veiculado em fórmula e aplicado em dois tratamentos sucessivos. O AM é atraído pela carga negativa das mitocôndrias, principal local de ação do fenotiazínico catiônico, cuja dimerização é induzida no interior da organela e dependendo do potencial de membrana mitocondrial (SEVERINO et al., 2003).

Quanto à estabilidade da formulação desenvolvida, considera-se seguro o prazo de 12 meses. Ao analisar detalhadamente os dados de razão D/M apresentados na Tabela 7, nota-se que as medidas obtidas são muito próximas, sem variação de valores entre as triplicatas avaliadas nos tempos iniciais, de forma que houve diferença significante em relação ao tempo final que apresentou pequenas variações numéricas entre as triplicatas, com valores muito próximos, o que na prática pode não ser tão relevante para comprometer a estabilidade da formulação. Os demais atributos avaliados mantiveram-se estáveis ao longo de 1 ano para as características organolépticas, pH e quantificação do AM em comprimento de onda de 663 nm. Estudos complementares devem ser realizados para estabelecer outros critérios de estabilidade, considerando que o aumento da agregação do AM a partir de 6 meses pode vir a influenciar negativamente o resultado da aPDT.

Ademais, pesquisas futuras podem ser sugeridas a partir desse trabalho a fim de investigar a liberação do AM da formulação desenvolvida com polímero, analisar se há um limite da quantidade liberada e sua influência na entrega em possíveis diferentes alvos celulares no microrganismo, encontrar a dosimetria adequada para clínica avaliando fotobranqueamento e formação de leuco-AM durante a irradiação e incorporação, bem como avaliar a aPDT com a formulação associada a inibidores da bomba de efluxo e ainda, combinada a tratamentos convencionais, tais como hipoclorito ou fluconazol, com o intuito de ampliar a compreensão em torno deste assunto e favorecer a eficiência antimicrobiana.

6 CONCLUSÃO

Foram definidas as farmacotécnicas de preparo das formulações odontológicas com AM e adjuvantes farmacotécnicos contendo o polímero não-iônico HPMC ou o polímero aniônico CMC.

A razão D/M do AM veiculado em formulação sem SDS apresenta menor agregação conforme é aumentada a concentração dos polímeros HPMC ou CMC. A avaliação das propriedades de agregação do AM nas diferentes preparações formuladas indicou menores valores de razão D/M para as formulações veiculadas na presença do tensoativo SDS.

As propriedades de viscosidade e densidade das formulações foram definidas e as fórmulas selecionadas foram submetidas aos ajustes de pH para avaliação das propriedades de agregação do AM em meio ácido, neutro e alcalino.

Ao comparar os polímeros não-iônico e aniônico em cada um dos pH contemplados, foi observada significativa redução da agregação do AM com as formulações de CMC, mais precisamente em pH ácido, sendo definida a concentração de 0,5% desse polímero a ser formulada em pH 5,0 para prosseguir com os próximos ensaios**.**

A avaliação da agregação das formulações em diferentes concentrações do FS demonstrou que 0,010% de AM apresenta elevada razão D/M, enquanto as concentrações 0,002% e 0,005% favorecem uma menor agregação, sem diferenças estatísticas entre si.

A formulação contendo 0,005% de AM apresentou menor porcentagem de incorporação em biofilme de 24h de *Candida albicans* em relação à solução aquosa de mesma concentração do FS em qualquer período de incubação avaliado.

A viabilidade em biofilme maduro de *C. albicans* com 24h de crescimento após aPDT a 660 nm, 37,3 mW/cm^2, 60,4 J/cm^2 durante 27 min de iluminação demonstrou pequena redução (0,22 Log UFC/mL) apenas para fórmula contendo 0,005% de AM em relação ao controle.

Em biofilme de *C. albicans* em dispersão, de 48h de crescimento a aPDT a 660 nm, 37,3 mW/cm^2, 120,8 J/cm^2 durante 54 min demonstrou maior eficácia obtendo significativa redução para todos os grupos contendo FS veiculado em

água ou formulação nas concentrações de 0,005% ou 0,010% de AM. A irradiação direta de 54 min apesar de apresentar redução média de 0,88 Log UFC/mL, tal valor não foi suficiente para obter inativação celular. O melhor desempenho antimicrobiano, foi alcançado com a aplicação de duplo tratamento de 27 minutos de irradiação cada, atingindo redução média máxima de 4,26 Log para o AM 0,005% veiculado na formulação desenvolvida, sem diferença significante entre os grupos contendo FS, com redução média entre eles de 3,81 Log UFC/mL.

A incorporação do AM parece não influenciar a eficácia da aPDT, vide que AM em água apresenta maior incorporação do que veiculado em fórmula, mas a ação antimicrobiana foi similar. Não se sabe exatamente se outros fatores vinculados à presença do polímero podem favorecer a interação com a célula.

A relação D/M ligeiramente maior na formulação que em solução aquosa com SDS também não impactou o resultado de viabilidade obtendo significativa redução do número de células e proporcionando um produto mais viscoso, com maior capacidade de bioadesão, porém ainda fluido, favorecendo a aplicação clínica facilitada e a manutenção no local, sem escorrer.

A estabilidade físico-química da formulação foi estabelecida com um prazo de segurança de 12 meses.

Estudos adicionais devem ser continuados visando o aperfeiçoamento da formulação para que alcance melhor desempenho para aPDT clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A&D. **SV Series: Sine-Wave Vibro Viscometer**. Disponível em: <https://www.aandd.jp/products/test_measuring/sv10/sv10spec.html>. Acesso em: 23 abr. 2024.

AHUJA, V. et al. Biological and pharmacological potential of xylitol: A molecular insight of unique metabolism. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1–24, 2020.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 8ª ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALLEN JR, L. V. et al. **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 22nd. ed. [s.l.] Pharmaceutical Press, 2012.

ALMEIDA, J. M. **Influência do pH da droga fotossensibilizadora no reparo periodontal em ratos tratados pela terapia fotodinâmica antimicrobiana.** Araçatuba:UNESP, Faculdade de Odontologia, , 2017.

AMARAL, L. F. B. et al. Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoesteras an alternative preservative for cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, p. 391–397, 2011.

ANVISA. **Confira dados mundiais sobre resistência microbiana. Notícias: Conscientização e Mobilização, 23/11/2021.** Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/confira-dados-mundiais-sobre-resistencia-microbiana#:~:text=Dados da OMS mostram,ou septisemia) e pneumonia evitáveis>.

ANVISA. **Programa Nacional de Prevenções e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025.** Brasília:Equipe Técnica GVIMS/GGTES/Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras_2021_2025.pdf>

APPEL, G.; RÉUS, M. **Formulações aplicadas à odontologia.** 1ª ed. São Paulo: RCN Editora, 2005.

BACELLAR, I. O. L. et al. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.

BAPTISTA, A. et al. Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of Candida albicans. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 177, p. 76–84, dez. 2017.

BASTOS, J. R. M. et al. Utilization of xylitol as a preventive substance in dentistry. **Braz J Oral Sci.**, v. 4, n. 15, p. 891–893, 2005.

BERGMANN, K.; O'KONSKI, C. T. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite. **Journal of Physical Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 2169–2177, 1963.

BONNEAU, R. et al. pH DEPENDENCE OF SINGLET OXYGEN PRODUCTION IN AQUEOUS SOLUTIONS USING THIAZINE DYES AS PHOTOSENSITIZERS. **Photochemistry and Photobiology**, v. 21, p. 159–163, 1975.

BRASIL. **Resolução - RDC Nº 199, de 26 de outubro de 2006. Diário Oficial da União (DOU) publicado em: 30/10/2006. Edição: 208. Seção: 1. Republicada no DOU de 02/04/2007, por ter saído com incorreção no original.** Brasília:Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada., , 2006. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0199_26_10_2006.html>

BRASIL. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira. 2.ed.** Brasília:Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa, , 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-nacional/arquivos/8065json-file-1>

BRASIL. **Resolução - RDC Nº 107, de 5 de setembro de 2016. Diário Oficial da União (DOU) publicado em: 06/09/2016. Edição: 172. Seção: 1.** Brasília:Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada., , 2016. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/23527924/do1-2016-09-06-resolucao-rdc-n-107-de-5-de-setembro-de-2016-23527827>

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira.** 6ª edição. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária., 2019a. v. I

BRASIL. **Resolução - RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019. Diário Oficial da União (DOU) publicado em: 07/11/2019. Edição: 216. Seção: 1.**

Brasília:Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada., , 2019b.

BRITO, A. M. M.; SANTOS, H. F.; NANTES-CARDOSO, I. L. Estratégia experimental para análise espectroscópica de estados agregados de corantes. Em: MARAVIESKI SP (Ed.). **Teorias e métodos da biofísica.** Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. p. 43–59.

CATIRSE, A. B. C. E. B. et al. **Manual de materiais dentários**. Ribeirão Preto: Departamento de Materiais Dentários e Prótese. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2020.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019** (U. S. D. of H. and H. Services, Ed.)**U.S Department of Health and Human services**. Atlanta, GA: [s.n.]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html>.

CECATTO, R. B. et al. Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human 11 studies: The state of the art. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 27, n. 101828, 2020.

CHEN, J.; CESARIO, T. C.; RENTZEPIS, P. M. Effect of pH on methylene blue transient states and kinetics and bacteria photoinactivation. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 13, p. 2702–2707, 2011.

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

COLLINA, G. A. DA et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic Candida albicans is increased in sodium dodecyl sulfate. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, n. November 2019, p. 101612, 2020.

COLLINA, G. A. DA et al. The importance of combining methods to assess Candida albicans biofilms following photodynamic inactivation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 102769, 2022.

DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, p. 1–16, 2012.

DEAN, J. C. et al. Methylene Blue Exciton States Steer Nonradiative Relaxation: Ultrafast Spectroscopy of Methylene Blue Dimer. **J.Phys.Chem.B**, v. 120, p. 440–454, 2016.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2329–2335, jun. 2005.

DIAS, L. M. et al. The Effect of Sub-Lethal Successive Applications of Photodynamic Therapy on Candida albicans Biofilm Depends on the Photosensitizer. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 111, 13 jan. 2023.

ECKLEY, C. A.; COSTA, H. O. Estudo comparativo do pH e do volume salivar em indivíduos com laringofaringite crônica por doença do refluxo gastroesofágica antes e após o tratamento. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 1, p. 55–60, 2006.

FEKSA, L. R. et al. Hydrogels for biomedical applications. Em: **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 403–438.

FERREIRA, A. DE O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 2ª edição ed. Juiz de Fora: Pharmabooks, 2002.

FERRO, S. V. F.; BARBOSA, S. N. **Terapia fotodinâmica como tratamento adjuvante da periodontite em pacientes fumantes: revisão sistemática**. MaceióCentro Universitário Tiradentes – UNIT/AL, , 2019.

FIGUEIRÊDO JÚNIOR, E. C. et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana como recurso adjuvante no tratamento endodôntico em dentes infectados_ análise bibliométrica e revisão de literatura. **Arch Health Invest**, v. 10, n. 1, p. 179–186, 2021.

FILIPINI, S. M. R. et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy using methylene blue/ethanol formulation in experimental periodontitis in diabetic rats: short-term results. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 6, p. 1253–1260, 2019.

GABRIELLI, D. et al. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227–232, 2007.

GALO, I. D. C. et al. The ineffectiveness of antimicrobial photodynamic therapy in the absence of preincubation of the microorganisms in the photosensitizer. **Fisioter. mov.**, v. 33, n. e003304, 2020.

GARCEZ, A. S. et al. Uma nova estratégia para PDT antimicrobiana em Endodontia. **Rev Assoc Paul Cir Dent.**, v. 70, n. 2, p. 126–30, 2016.

GARG, A. et al. In-situ gel: A smart carrier for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 652, p. 123819, mar. 2024.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12(3), n. 034029, p. 1–10, 2007.

GONÇALVES, J. M. L. A. et al. The combination of methylene blue and sodium dodecyl sulfate enhances the antimicrobial photodynamic therapy of Candida albicans at lower light parameters. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, n. 103583, 2023.

GONÇALVES, N. C. L. A. V. et al. Efeito de soluções fluoretadas contendo xilitol e sorbitol no número de estreptococos do grupo mutans na saliva de seres humanos. **Pan Am J Public Health**, v. 9, n. 1, 2001.

GUSMAN, D. J. R. et al. pH influences the biocompatibility of methylene blue solutions. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 1, p. 361–367, 2018.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 436–450, 30 abr. 2004.

HEGER, D.; JIRKOVSK, J.; KLA, P. Aggregation of Methylene Blue in Frozen Aqueous Solutions Studied by Absorption Spectroscopy. **J. Phys. Chem. A**, v. 109, p. 6702–6709, 2005.

HUANG, T.-C. et al. Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, p. 7–16, 2019.

IMPERT, O. et al. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(ii)–halide species in acidic aqueous media. **Dalton Transactions**, n. 3, p. 348–353, 29 jan. 2003.

JUNQUEIRA, H. C. C. et al. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, n. 11, p. 2320–2328, 2002.

KOSTJUKOVA, L. O.; LEONTIEVA, S. V; KOSTJUKOV, V. V. Vibronic absorption spectrum and electronic properties of methylene blue in aqueous solution : TD-DFT study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 336, p. 116369, 2021.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. Inflamação e reparo. Em: **Robbins e Cotran, patologia: bases patológicas das doenças**. 9. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 71–112.

LAM, M. et al. Photodynamic Therapy with Pc 4 Induces Apoptosis of Candida albicans. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 904–909, 2011.

LEAL, C. R. L. et al. **Aplicação da terapia fotodinâmica com uso do LED e azul de metileno em Streptococcus mutans - estudo in vitro.** Foz do Iguaçu:XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, , 2016.

LEE, S.-K.; MILLS, A. Novel photochemistry of leuco-Methylene Blue. **Chemical Communications**, n. 18, p. 2366, 2003.

LEWIS, G. N. et al. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, n. 6, p. 1150–1154, 1943.

LIMA, A. et al. **Efeito do solvente sobre as propriedades espectroscópicas do azul de metileno.** Universidade do Vale do Paraíba:XI Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação., , 2007.

LIMA, A. et al. **Efeito Solvente sobre as Propriedades Fotofísicas do Azul de Metileno usando a Técnica de Espalhamento de Luz Ressonante (RLS).** SBQ:31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., , 2008.

LIN, C. N.; DING, S. J.; CHEN, C. C. Synergistic photoantimicrobial chemotherapy of methylene blue-encapsulated chitosan on biofilm-contaminated titanium. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 4, 2021.

LOPEZ, M. A. et al. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy (PDT) in periodontitis and peri-implantitisa systematic review. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 34, n. 5, p. 59–65, 2020.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, L. et al. Effects of photodynamic therapy on Enterococcus faecalis biofilms. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1519–1526, 2015.

LUNDSTRÖM, T. et al. Equine saliva components during mastication, and in vivo pH changes in the oral bioflm of sound and carious tooth surfaces after sucrose exposure. **Acta Vet Scand**, v. 62, n. 21, 2020.

LUO, Y. et al. Visible light mediated killing of multidrug-resistant bacteria using photoacids. **Journal of Materials Chemistry B**, n. 7, 2013.

LYON, J. P. L. M. M. et al. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 54, p. e265–e271, 2011.

MACHADO, G. B. et al. Enhancing antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium dyes and sodium dodecyl sulfate against Candida albicans at various growth stages. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, n. 103628, 2023.

MELENDEZ-CELIS, U. et al. Organic light emitting diode for in vitro antimicrobial photodynamic therapy of Candida strains. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. June, p. 102567, 2021.

MILLS, A.; WANG, J. Photobleaching of methylene blue sensitised by TiO2: an ambiguous system? **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 127, n. 1–3, p. 123–134, out. 1999.

MOREIRA, L. M. et al. Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico- químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila a. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 258–262, 2010.

MUHAMMAD, M. T.; KHAN, M. N. Study of electrolytic effect on the interaction between anionic surfactant and methylene blue using spectrophotometric and conductivity methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 234, p. 309–314, 2017.

NADTOKA, O. et al. Synthesis and performance of hybrid hydrogels loaded with methylene blue and its use for antimicrobial photodynamic inactivation. **Journal of Chemistry**, v. 2020, 2020.

NADTOKA, O.; VIRYCH, P.; KUTSEVOL, N. Hydrogels Loaded with Methylene Blue: Sorption-Desorption and Antimicrobial Photoactivation Study. **International Journal of Polymer Science**, v. 2020, 2020.

NUNES, I. P. F. et al. Evaluation of dual application of photodynamic therapy — PDT in Candida albicans. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, n. December 2022, p. 1–10, 2023.

OLIVEIRA, F. C. S. et al. Azul de metileno para fins terapêuticos. **Braz. J. Surg. Clin. Res.**, v. 27, n. 2, p. 66–70, 2019.

OLIVEIRA-SILVA, T. et al. **Investigação do efeito fotodinâmico em cepas de Candida albicans pré-tratadas com glicose – estudo in vitro.** Foz do Iguaçu:XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, , 2016.

PAHO. **Pan-Americana Health Organization. Annual Report of the Director 2019: Advancing the Sustainable Health Agenda for the Americas 2018-2030.** Washington, DCExecutive Summary., , 2019.

PAVANI, C. et al. **Uso de azul de metileno em terapia fotodinâmica e formulação para uso oral.** Brasil:INPI BR 10 2017 Patent N.025390-2, , 2017.

PEREIRINHA, P. R. R.; FIGUEIRAS, A. R. R. Desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para a administração controlada de fármacos. **Informative Geum Bulletin**, v. 7, n. 2, p. 63–81, 2016.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 4ª ed. Barueri, SP: Manole, 2015.

PRATES, R. A. et al. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of Candida albicans. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 1525–1532, 2011.

PROCHNOW, E. P. et al. Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic photosensitizers in formulations with ethanol on Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 291–296, 2016.

ROCHA, B. S.; LIMA, C. S. A.; YARA, R. Produtos naturais aplicados como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica: uma revisão bibliográfica. Em: OLIVEIRA JUNIOR, J. M. B.; CALVÃO, L. B. (Eds.). **Ciências biológicas: campo promissor em pesquisa 3**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020. p. 266–278.

SAKAE, L. O. et al. An in vitro study on the influence of viscosity and frequency of application of fluoride/tin solutions on the progression of erosion of bovine enamel. **Archives of Oral Biology**, v. 89, p. 26–30, 2018.

SANTIN, L. R. R. et al. Study between solvatochromism and steady-state and time-resolved fluorescence measurements of the Methylene blue in binary mixtures. **Dyes and Pigments**, v. 119, p. 12–21, 2015.

SANTOS, A. M. **Atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores clorina e6 e azul de metileno associados a nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser.** Rio de Janeiro:Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, , 2018.

SEVERINO, D. et al. Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 5, p. 459–468, 2003.

SHARMA, M.; DUBE, A.; MAJUMDER, S. K. Antibacterial photodynamic activity of photosensitizer-embedded alginate-pectin-carboxymethyl cellulose composite biopolymer films. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 4, p. 763–772, 7 jun. 2021.

SIGMA-ALDRICH. **Product Specification: Carboxymethylcellulose sodium salt - Medium viscosity**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/c4888>. Acesso em: 25 ago. 2023a.

SIGMA-ALDRICH. **Product Specification: (Hydroxypropyl)methyl cellulose**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/h9262>. Acesso em: 25 ago. 2023b.

SILVA, A. C. et al. Diagnóstico diferencial e conduta terapêutica na displasia óssea periapical: relato de caso. **RSD**, v. 9, n. 11, p. e38191110018, 2020.

SILVA, J. B. DA; COOK, M. T.; BRUSCHI, M. L. Thermoresponsive systems composed of poloxamer 407 and HPMC or NaCMC: mechanical, rheological and sol-gel transition analysis. **Carbohydrate Polymers 240**, v. 1162683, 2020.

SILVA, E. S. et al. Capítulo 5: Terapia fotodinâmica. Em: FERNANDES, K. P. S.; FERRARI, R. A. M.; FRANÇA, C. M. (Eds.). **Biofotônica: conceitos e aplicações.** São Paulo: UNINOVE, Universidade Nove de Julho, 2017.

SILVESTRE, A. L. P. et al. Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral

infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120078, jan. 2021.

SIMÕES, T. M. S.; CATÃO, M. H. C. DE V. Aplicação clínica da terapia laser na Endodontia. **Arch Health Invest**, v. 10, n. 1, p. 140–146, 2021.

SINGANA, T.; SUMA, N. K. An In Vitro Assessment of Cariogenic and Erosive Potential of Pediatric Liquid Medicaments on Primary Teeth: A Comparative Study. **Int J Clin Pediatr Dent**, v. 13, n. 6, p. 595–599, 2020.

SOUSA, J. N. L. DE et al. Photoinactivation of Candida albicans using methylene blue as photosensitizer. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 63, n. 4, p. 411–417, 2015.

TADA, D. B. **Desenvolvimento de nanopartículas fotossensibilizadoras.** São Paulo:Instituto de Química, , 2007.

TANG, W. et al. Photodynamic Characterization and In Vitro Application of Methylene Blue-containing Nanoparticle Platforms. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 81, p. 242–249, 2005.

TARDIVO, J. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 2, p. 175–191, 2005.

TEDESCO, A. C.; RIBEIRO, M. S.; PAULA, L. B. DE. Novas tecnologias em fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica. Em: NUNEZ, S. C.; GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S. (Eds.). **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

TEODORO, P.; FERNANDES, H. V. The use of photodynamic therapy as an alternative method of treating oral candidiasis. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 3, n. 1, p. 14–23, 2020.

THOMPSON, J. E.; DAVIDOW, L. W. **A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice**. 3rd. ed. [s.l.] Lippincott Williams and Wilkins, 2009.

THOMPSON, W. et al. **The essential role of the dental team in reducing antibiotic resistance**. Geneva: [s.n.].

TORRES, C. R. G. et al. Antimicrobial agents and your potential of use in odontology. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v. 3, n. 2, p. 43–52, 2000.

TORRES-HURTADO, S. A. et al. Efficient in vitro photodynamic inactivation using repetitive light energy density on Candida albicans and Trichophyton mentagrophytes. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, n. November 2018, p. 203–209, 2019.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 311–319, 2 dez. 2003.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 51–64, 2010.

VILSINSKI, B. H. et al. Photophysics and drug delivery behavior of methylene blue into Arabic-gum based hydrogel matrices. **Materials Today Communications**, v. 26, n. July 2020, p. 1–9, 2021.

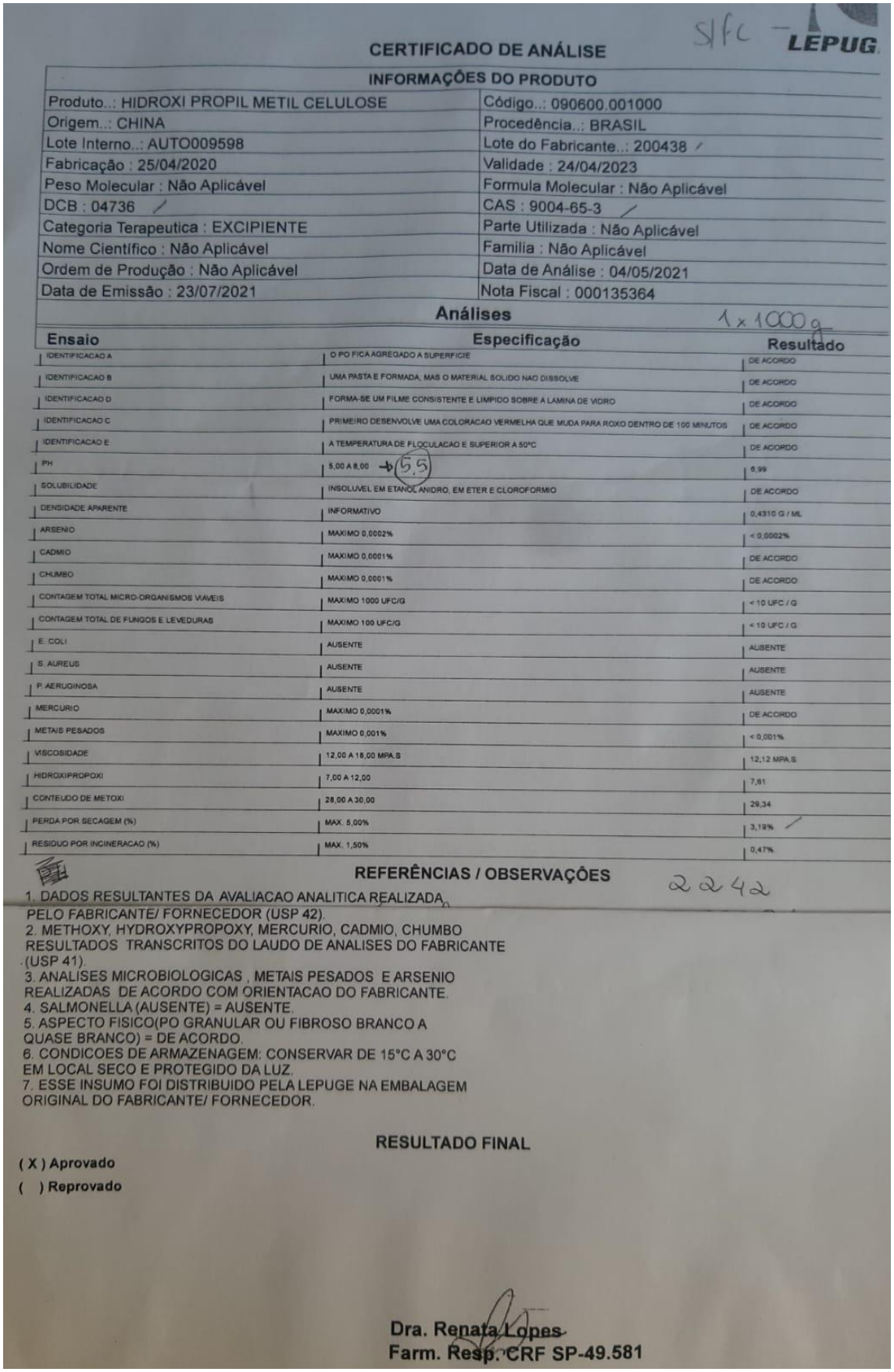
VITO, A. DE; ROMÃO JÚNIOR, W. **Manipulação dos Biomateriais Odontológicos Diretos - guia prático visual V.1**. São Paulo: Universidade Nove de Julho – UNINOVE, 2022.

WHO. **2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development**. Geneva: World Health Organization, 2021.

WHO. **Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>. Acesso em: 25 jun. 2024.

WIENCH, R. et al. Influence of Incubation Time on Ortho-Toluidine Blue Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy Directed against Selected Candida Strains—An In Vitro Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 10971, 11 out. 2021.

ANEXO A – Laudo analítico de Controle de Qualidade do HPMC



SIFC – LEPUG

CERTIFICADO DE ANÁLISE

INFORMAÇÕES DO PRODUTO

Produto..: HIDROXI PROPIL METIL CELULOSE	Código..: 090600.001000
Origem..: CHINA	Procedência..: BRASIL
Lote Interno..: AUTO009598	Lote do Fabricante..: 200438
Fabricação : 25/04/2020	Validade : 24/04/2023
Peso Molecular : Não Aplicável	Formula Molecular : Não Aplicável
DCB : 04736	CAS : 9004-65-3
Categoria Terapeutica : EXCIPIENTE	Parte Utilizada : Não Aplicável
Nome Científico : Não Aplicável	Familia : Não Aplicável
Ordem de Produção : Não Aplicável	Data de Análise : 04/05/2021
Data de Emissão : 23/07/2021	Nota Fiscal : 000135364

Análises

1 x 1000 g

Ensaio	Especificação	Resultado
IDENTIFICACAO A	O PO FICA AGREGADO A SUPERFICIE	DE ACORDO
IDENTIFICACAO B	UMA PASTA E FORMADA, MAS O MATERIAL SOLIDO NAO DISSOLVE	DE ACORDO
IDENTIFICACAO D	FORMA-SE UM FILME CONSISTENTE E LIMPIDO SOBRE A LAMINA DE VIDRO	DE ACORDO
IDENTIFICACAO C	PRIMEIRO DESENVOLVE UMA COLORACAO VERMELHA QUE MUDA PARA ROXO DENTRO DE 100 MINUTOS	DE ACORDO
IDENTIFICACAO E	A TEMPERATURA DE FLOCULACAO E SUPERIOR A 50°C	DE ACORDO
PH	5,00 A 8,00 → (5,5)	6,99
SOLUBILIDADE	INSOLUVEL EM ETANOL ANIDRO, EM ETER E CLOROFORMIO	DE ACORDO
DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO	0,4310 G / ML
ARSENIO	MAXIMO 0,0002%	< 0,0002%
CADMIO	MAXIMO 0,0001%	DE ACORDO
CHUMBO	MAXIMO 0,0001%	DE ACORDO
CONTAGEM TOTAL MICRO-ORGANISMOS VIAVEIS	MAXIMO 1000 UFC/G	< 10 UFC / G
CONTAGEM TOTAL DE FUNGOS E LEVEDURAS	MAXIMO 100 UFC/G	< 10 UFC / G
E. COLI	AUSENTE	AUSENTE
S. AUREUS	AUSENTE	AUSENTE
P. AERUGINOSA	AUSENTE	AUSENTE
MERCURIO	MAXIMO 0,0001%	DE ACORDO
METAIS PESADOS	MAXIMO 0,001%	< 0,001%
VISCOSIDADE	12,00 A 18,00 MPA.S	12,12 MPA.S
HIDROXIPROPOXI	7,00 A 12,00	7,81
CONTEUDO DE METOXI	28,00 A 30,00	29,34
PERDA POR SECAGEM (%)	MAX. 5,00%	3,19%
RESIDUO POR INCINERACAO (%)	MAX. 1,50%	0,47%

REFERÊNCIAS / OBSERVAÇÕES

2242

1. DADOS RESULTANTES DA AVALIACAO ANALITICA REALIZADA PELO FABRICANTE/ FORNECEDOR (USP 42).
2. METHOXY, HYDROXYPROPOXY, MERCURIO, CADMIO, CHUMBO RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO DE ANALISES DO FABRICANTE (USP 41).
3. ANALISES MICROBIOLOGICAS , METAIS PESADOS E ARSENIO REALIZADAS DE ACORDO COM ORIENTACAO DO FABRICANTE.
4. SALMONELLA (AUSENTE) = AUSENTE.
5. ASPECTO FISICO(PO GRANULAR OU FIBROSO BRANCO A QUASE BRANCO) = DE ACORDO.
6. CONDICOES DE ARMAZENAGEM: CONSERVAR DE 15°C A 30°C EM LOCAL SECO E PROTEGIDO DA LUZ.
7. ESSE INSUMO FOI DISTRIBUIDO PELA LEPUGE NA EMBALAGEM ORIGINAL DO FABRICANTE/ FORNECEDOR.

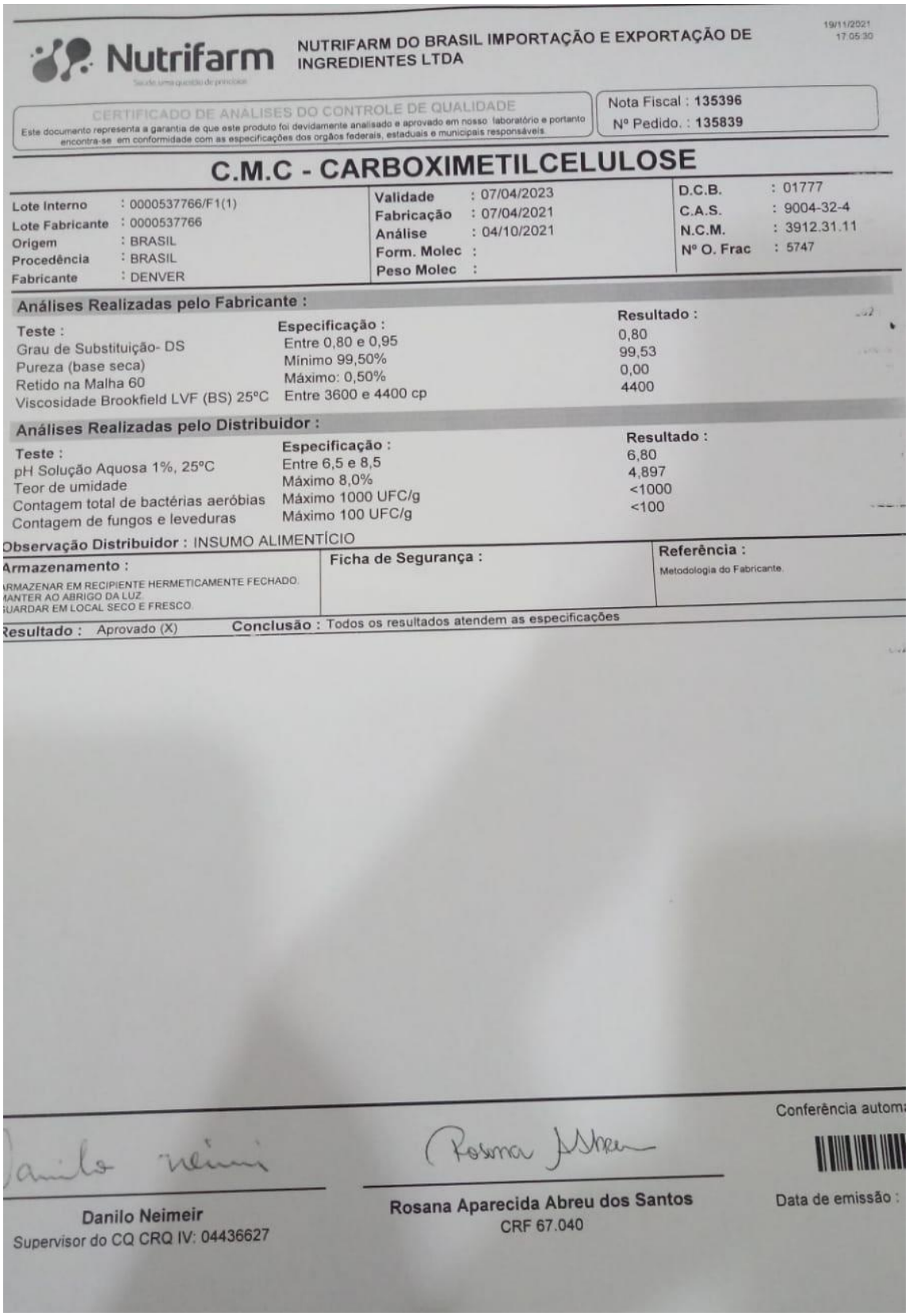
RESULTADO FINAL

(X) Aprovado

( ) Reprovado

Dra. Renata Lopes
Farm. Resp. CRF SP-49.581

ANEXO B – Laudo analítico de Controle de Qualidade do CMC



Nutrifarm

NUTRIFARM DO BRASIL IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE INGREDIENTES LTDA

19/11/2021 17:05:30

CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Este documento representa a garantia de que este produto foi devidamente analisado e aprovado em nosso laboratório e portanto encontra-se em conformidade com as especificações dos orgãos federais, estaduais e municipais responsáveis.

Nota Fiscal : 135396
Nº Pedido. : 135839

C.M.C - CARBOXIMETILCELULOSE

Lote Interno	: 0000537766/F1(1)	Validade	: 07/04/2023	D.C.B.	: 01777
Lote Fabricante	: 0000537766	Fabricação	: 07/04/2021	C.A.S.	: 9004-32-4
Origem	: BRASIL	Análise	: 04/10/2021	N.C.M.	: 3912.31.11
Procedência	: BRASIL	Form. Molec	:	Nº O. Frac	: 5747
Fabricante	: DENVER	Peso Molec	:		

Análises Realizadas pelo Fabricante :

Teste :	Especificação :	Resultado :
Grau de Substituição- DS	Entre 0,80 e 0,95	0,80
Pureza (base seca)	Mínimo 99,50%	99,53
Retido na Malha 60	Máximo: 0,50%	0,00
Viscosidade Brookfield LVF (BS) 25ºC	Entre 3600 e 4400 cp	4400

Análises Realizadas pelo Distribuidor :

Teste :	Especificação :	Resultado :
pH Solução Aquosa 1%, 25ºC	Entre 6,5 e 8,5	6,80
Teor de umidade	Máximo 8,0%	4,897
Contagem total de bactérias aeróbias	Máximo 1000 UFC/g	<1000
Contagem de fungos e leveduras	Máximo 100 UFC/g	<100

Observação Distribuidor : INSUMO ALIMENTÍCIO

Armazenamento :	Ficha de Segurança :	Referência :
ARMAZENAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO. MANTER AO ABRIGO DA LUZ. GUARDAR EM LOCAL SECO E FRESCO.		Metodologia do Fabricante.

Resultado : Aprovado (X) **Conclusão :** Todos os resultados atendem as especificações

Conferência autom

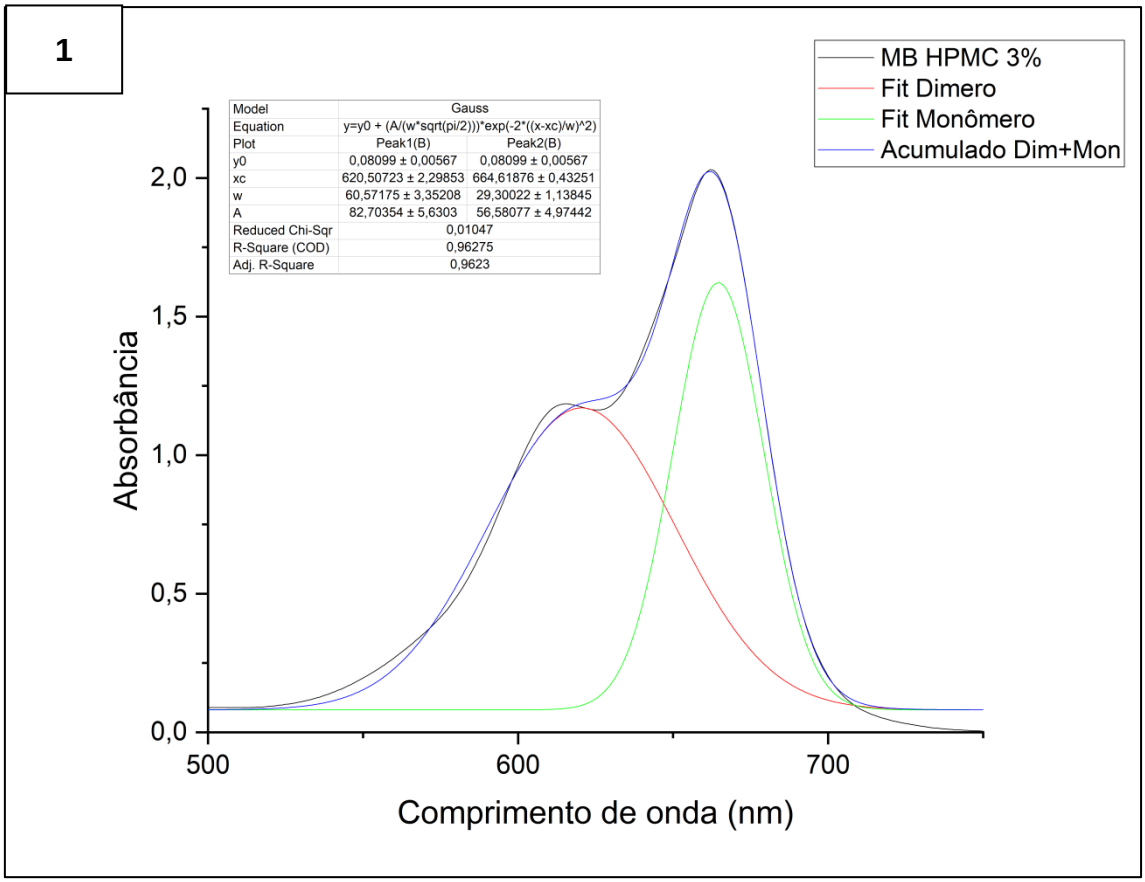
Danilo Neimeir
Supervisor do CQ CRQ IV: 04436627

Rosana Aparecida Abreu dos Santos
CRF 67.040

Data de emissão :

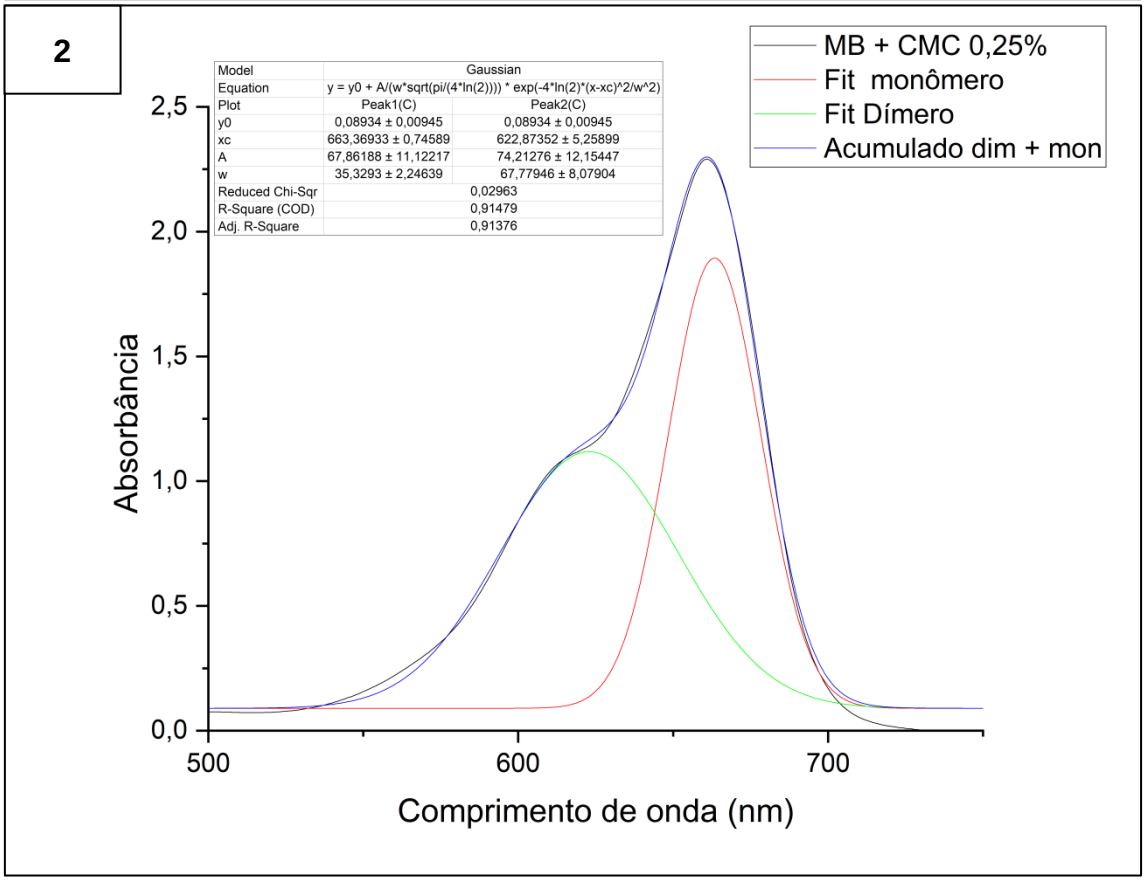
ANEXO C – Gráficos de deconvolução: polímeros HPMC e CMC

1



Model	Gauss	
Equation	y=y0 + (A/(w*sqrt(pi/2)))*exp(-2*((x-xc)/w)^2)	
Plot	Peak1(B)	Peak2(B)
y0	0,08099 ± 0,00567	0,08099 ± 0,00567
xc	620,50723 ± 2,29853	664,61876 ± 0,43251
w	60,57175 ± 3,35208	29,30022 ± 1,13845
A	82,70354 ± 5,6303	56,58077 ± 4,97442
Reduced Chi-Sqr	0,01047	
R-Square (COD)	0,96275	
Adj. R-Square	0,9623	

2



Model	Gaussian	
Equation	y = y0 + A/(w*sqrt(pi/(4*ln(2)))) * exp(-4*ln(2)*(x-xc)^2/w^2)	
Plot	Peak1(C)	Peak2(C)
y0	0,08934 ± 0,00945	0,08934 ± 0,00945
xc	663,36933 ± 0,74589	622,87352 ± 5,25899
A	67,86188 ± 11,12217	74,21276 ± 12,15447
w	35,3293 ± 2,24639	67,77946 ± 8,07904
Reduced Chi-Sqr	0,02963	
R-Square (COD)	0,91479	
Adj. R-Square	0,91376	

ANEXO D – Manuscritos publicados

Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102769. Acesso em 31/05/2023.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 38 (2022) 102769

Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt



The importance of combining methods to assess Candida albicans biofilms following photodynamic inactivation

Gabriela Alves da Collina [a], Fernanda Viana Cabral [b], Carolina Montovam Monteiro [a], Gabriela Benedito Machado [a], José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves [a], Fernanda Freire [a], Renato Araújo Prates [a], Martha Simões Ribeiro [b], Christiane Pavani [a,*]

[a] Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil
[b] Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN), São Paulo, SP, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT)
Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)
3D organization

ABSTRACT

Background: Methylene blue (MB)-mediated photodynamic inactivation (PDI) has shown good results in killing *Candida spp.* Although MB solutions are commonly used, new formulations have been designed to improve PDI. However, chemical substances in the formulation may interfere with the PDI outcome. In this sense, different methodologies should be used to evaluate PDI *in vitro*. Herein, we report different methodologies to evaluate the effects of PDI with an oral formulation (OF) containing 0.005% MB on *Candida albicans* biofilm. Methods: Biofilms were treated using the MB-OF, with 5 min pre-irradiation time and exposure to a 640 nm LED device (4.7 J/cm^2). PDI was evaluated by the XTT reduction test, counting the colony forming units (CFU), a filamentation assay, crystal violet (CV) staining, and scanning electronic microscopy (SEM). Results: PDI was able to reduce around 1.5 $\log_{10}$ CFU/mL, even though no significant differences were noted in metabolic activity in comparison to the control immediately after PDI. A significant decrease in yeast to hyphae transition was observed after PDI, while the biofilm exhibited flattened cells and a reduced number of yeasts in SEM. The CV assay showed increased biomass. Conclusion: MB-OF-mediated PDI was effective in *C. albicans* biofilms, as it significantly reduced the CFU/mL and the virulence of surviving cells. The CV data were inconclusive, since the OF components interacted with the CV, making the data useless. Taken together, our data suggest that the association of different methods allows complementary responses to assess how PDI mediated by a formulation impacts biofilms.

1. Introduction

Candidiasis is an opportunistic fungal infection that is considered to be the most common in humans. Recently, *Candida ssp* infections have grown worldwide due to the increased misuse of antifungals, associated with the higher use of medical devices, such as heart valves, vascular bypass, dental implants, and catheters, where biofilms can establish [1]. The organized biofilm structure facilitates the persistence of colonization, dissemination, and invasion of the yeast. Indeed, the biofilm also protects the pathogen from the immune system of the host and enables the yeast to tolerate a high concentration of antimicrobial agents [1,2]. The treatment of *Candida* infections is a significant unsolved clinical problem worldwide, firstly due to the antifungal toxicity, especially to patients presenting other conditions (such as HIV) and also due to the emergency of drug-resistant strains, such as *Candida auris* [2,3]. New antifungal therapies are required to meet the great clinical challenge posed by Candida diseases [4–8].

Photodynamic inactivation (PDI) has been reported as an innovative approach for the reduction of *Candida* yeasts [9–15]. It involves the use of a light source, a photosensitive drug, and oxygen to generate reactive oxygen species and kill microbial cells by oxidative stress [16]. A pivotal difference between PDI and most antifungal agents is that the development of resistance to PDI by microorganisms is considered an unlikely event, since PDI is considered a typical multi-target process. Different photosensitizers, light dosimetry, and photosensitizer formulations have been widely investigated [12,13,17–20]. Drug delivery systems such as nanoparticles, liposomes, penetration enhancers, and other formulations have gained attention in recent years [21–23].

* Corresponding author at: Biophotonics Applied to Health Sciences Postgraduation Program, Universidade Nove de Julho, CEP 01504-001 São Paulo, Brazil.
E-mail addresses: marthasr@usp.br (M.S. Ribeiro), chrispavani@gmail.com (C. Pavani).

https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102769
Received 15 December 2021; Received in revised form 4 February 2022; Accepted 16 February 2022
Available online 18 February 2022
1572-1000/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

In this regard, the literature presents different methodologies to evaluate the antimicrobial effects on *Candida* biofilms *in vitro*, which are based upon optical density assays, such as XTT (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-5-phenylalanine-carbonyl-2H-tetrazolium hydroxide) [24,25], dry weight by crystal violet (CV) staining for biomass [25], counting the number of colony forming units (CFU) per mL, filamentation assay [26], microscopies such as fluorescence microscopy [27], and scanning electron microscopy (SEM) [25,28]. Each method provides specific information and carries its own strengths and weaknesses.

Nonetheless, singly these methods may provide incomplete information, depending upon the time point evaluated after PDI, as well as the possibility of interaction of the photosensitizer or formulation components to the assay. Indeed, it is not clear whether using drug delivery systems/formulations may affect the results obtained by the classical methods. In this work, we used different assays to evaluate the PDI action of an oral formulation containing methylene blue (MB-OF) on biofilms of *Candida albicans* [13]. We aimed to show how the data obtained by different methods complements each other and highlight some drawbacks of the methods that may confuse the interpretation of the PDI outcome.

2. Material and methods

2.1. Suspension preparation

Candida albicans yeast (ATCC 10,231) was grown for 48 h at 37 °C on Sabouraud dextrose agar (Kasvi, Curitiba, Brazil). The yeast was collected and transferred to a test tube containing Milli-Q water. After the preparation of the water suspension, the number of cells were counted using a Neubauer chamber and the suspension diluted to reach 3.0×10^7 cells/mL of *C. albicans* [13].

2.2. Biofilm growth

Forty-eight-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were treated with 200 μL/well of fetal bovine serum (FBS) (Vitrocel, São Paulo, Brazil) for 24 h at room temperature. The FBS was removed, and 100 μL of the yeast suspension (3.0×10^7 cells/mL), prepared as described previously, were added to the wells, along with 300 μL of the Sabouraud dextrose broth medium (Kasvi, Curitiba, Brazil). The plates were incubated for 48 h at 37 °C for biofilm formation. Then, the supernatant was discarded, and the biofilm was washed with phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.2 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, and 1.47 mM KH_2PO_4; the salts were purchased from Synth (Diadema, Brazil)) [13]. The biofilm was then submitted to PDI, according to the parameters described below, followed by the different methods of analysis.

2.3. Experimental conditions

After biofilm formation, samples were exposed to PDI using methylene blue (MB) 0.005% delivered in an oral formulation (MB-OF). This formulation, which is under patent (BR10201702539O2), was developed to control MB aggregation [12,13] due to the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.25% and has been shown to improve PDI efficacy [12,13]. The MB-OF was prepared by diluting a 1 mg/mL water MB (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) stock solution in OF to reach the desired concentration (0.005%). A physiological solution of NaCl 0.9% was used as a control (CT), and an OF without MB was also used for comparison.

The biofilms were exposed to the conditions presented above. A pre-irradiation time of 5 min was set, to allow MB uptake by the biofilm, followed by a red light-emitting diode (LED) irradiation of 30 min (Condulai, São Paulo, Brazil) with emission at 640 ± 12.5 nm and 2.6 mW/cm^2, positioned exactly above the plate (radiant exposure of 4.7 J/cm^2). This protocol was based upon a previous study of the group [13]. After irradiation, the following assays were performed, as described below: XTT reduction test, CFU/mL, filamentation assay, CV staining, and SEM. All the experiments were performed both in the dark and irradiated.

2.4. Analysis of biofilm by XTT

The biofilms were subjected to XTT assay. A 1 mg/mL XTT solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) was prepared in PBS, filtered with a 0.2 μm membrane, and stored at −70 °C. A 200 mM glucose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) solution was prepared in PBS. A water menadione solution (0.4 mM; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) was prepared immediately before the experiment. The XTT solution was thawed on ice before the experiment. Then, a mixture of these solutions was prepared at a proportion of 79 glucose: 20 XTT: 1 menadione v/v.

The biofilms were washed immediately after MB-OF mediated PDI. The control biofilms (CT and OF) were equally managed. One plate received Sabouraud dextrose broth medium and was incubated for 24 h at 37 °C before submission to the XTT assay. The other plate was immediately evaluated by XTT assay. The wells received the glucose/XTT/menadione solution, and the plates were incubated in the dark for 3 h at 37 °C. After incubation, 150 μL of the solution was transferred to a 96-well plate, and the optical density of the solution was measured using a microplate reader (SpectraMax – Molecular Devices, San José, USA) at 492 nm [24]. Three independent experiments were performed, each of which was carried out in triplicate.

2.5. Analysis of biofilm by counting CFU/mL

Immediately after the end of the treatment, the wells were washed with PBS, receiving 0.2 mL of PBS. The biofilm was disrupted by multiple pipetting and vortexing for 1 min. Then, an aliquot of 20 μL of each sample was diluted (10^{-1} to 10^{-5}). An aliquot of 20 μL of each dilution was seeded in lines into Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar, which were incubated at 37 °C for 24 h [13,29]. After incubation, the CFU/mL values were determined. For statistical analysis and comparison between groups, the CFU/mL data were converted to the linear scale. Three independents experiments were performed, each of which was carried out in triplicate.

2.6. Analysis of biofilm by filamentation assay

The filamentation assay was performed following a methodology described previously [26]. After treatment and CFU/mL count, colonies of *C. albicans* were incubated at 37 °C in Falcon tubes with 10 mL of Sabouraud dextrose broth medium for 24 h. These tubes were then centrifuged (1300 x g 10 min) once, and the number of *C. albicans* was standardized in a Neubauer chamber.

The *C. albicans* suspension (10^7 cells/mL) was mixed with 1 mL of distilled water with 10% FBS in a 24-well plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The plate was incubated at 37 °C for filamentation. After 24 h of incubation, 50 μL from the inoculum of each well were transferred to glass slides previously demarcated in 10 similar areas on the back of the slide. In each area, a randomly chosen microscopic field was observed under a light microscope Nikon Eclipse E200 (Tokyo, Japan) at 40x magnification and analyzed regarding *C. albicans* hyphae morphology. The following scores were attributed to the number of hyphae present in each microscopic field: 0, no hyphae; 1, 1–10 hyphae; 2, 11–20 hyphae; 3, 21–30 hyphae; 4, 31–40 hyphae; and 5, more than 41 hyphae. Two independent experiments were performed. Considering all the incubations carried out during this method, the filamentation analysis was performed 72 h after PDI.

2.7. Analysis of biofilm by CV staining assay

Crystal violet (Synth, Diadema, Brazil) staining was used to evaluate the total biomass. Immediately after PDI, the biofilm was gently washed with PBS, fixed in methanol for 20 min, and dried in air for 30 min. The samples were then stained for 15 min with 0.05% CV, and the CV solution was then removed and the samples gently washed in water. Finally, ethanol was used to dissolve the bound CV for 30 min, and the absorbance was measured using a microplate reader (SpectraMax – Molecular Devices, San José, USA) using a 492 nm filter. The data are presented as a percentage of the control (% CT), calculated by $A_{sample}*100/A_{CT}$.

2.8. Analysis of biofilm by SEM

Based upon the methodologies previously applied, acrylic resin discs of 11 mm diameter with a pin (Clássico, São Paulo, Brazil) were used as substrates for growing the biofilm [30]. Each substrate received two layers of nail polish (Risqué, São Paulo, Brazil), in the pin and base. These discs were placed in 24-well plates for biofilm formation, as previously reported. Immediately after PDI, the discs were fixed with 1 mL of glutaraldehyde at 2.5% for 1 h and then dehydrated with several ethanol washes (10%, 25%, 50%, 75%, and 90% for 20 min, and 100% for 1 h). The samples were then incubated at 37 °C for 24 h to dry the discs. No further sample preparation was needed. The biofilms were examined and photographed by low-vacuum scanning electronic microscopy (SEM, TableTop Microscope, TM3000, Hitashi, Tokyo, Japan), operating at 15 kV, in increments of 1000 and 5000 times [31]. Experiments were performed in triplicate on two different days.

2.9. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Microcal Origin software, and the Kolmogorov-Smirnov test was employed to evaluate data normality. For log CFU/mL and the CV assay, the gaussian data were compared by One-Way ANOVA followed by the Tukey post-hoc test; for XTT analysis, the gaussian data were analyzed by Two-Way Repeated measures ANOVA, followed by the Tukey post-hoc test. In the case of the filamentation test, the Kruskal-Wallis test was used for comparison of the non-parametric data, followed by the Mann-Whitney test. Differences between groups with $p<0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

The results showed that MB-OF mediated PDI on *C. albicans* biofilm was able to reduce around 1.5 $\log_{10}$ of CFU/mL, while no effect was observed in the OF group compared to the CT group (Fig. 1a). No effects were observed in the dark controls (data not shown).

Although PDI significantly reduced the mitochondrial metabolic

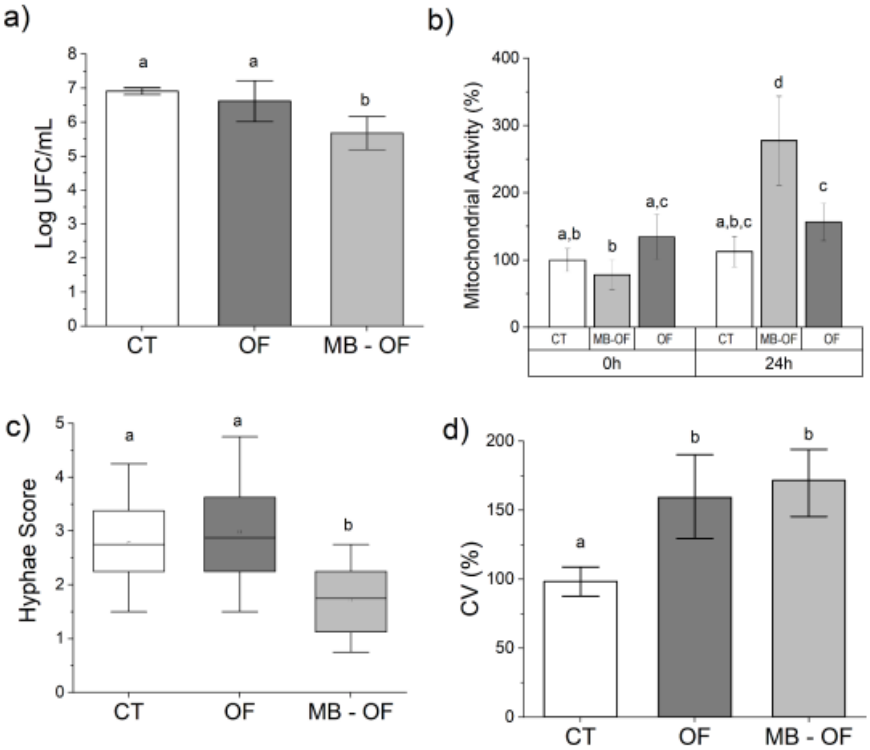


Fig. 1. Biofilm analysis after PDI treatment. Cells were treated with physiological solution (NaCl 0.9%) – CT (control) group; OF (oral formulation without MB); MB-OF (0.005% MB in oral formulation). a) CFU/mL count of *C. albicans* grown on Sabouraud agar. b) Evaluation of mitochondrial activity by XTT assay, immediately after PDI (0 h) and 24 h after PDI. c) Hyphae count in filamented samples 72 h post-PDI. d) Crystal violet staining for biomass analysis, immediately after PDI. Groups sharing the same letters present no statistically significant differences.

activity immediately after light exposure (0 h) compared to the OF group, no statistically significant differences were noted between the MB-OF and CT groups (Fig. 1b). However, 24 h after PDI, metabolic activity increased substantially in the MB-OF group, to around three times.

MB-OF-mediated PDI caused a significant reduction in yeast to hyphae transition, 72 h after irradiation (Fig. 1c). This finding suggests that PDI can prevent hyphae formation, thus reducing the virulence factors and infection ability.

The biofilms treated with OF and MB-OF immediately after PDI exhibited an increase in total biomass. This was a surprisingly result in comparison to others found here, since colony forming and hyphae numbers were reduced.

SEM was used to evaluate the biofilm architecture and cellular morphology, as displayed in Fig. 2. Our results showed that the CT group presented a pronounced number of hyphae, pseudohyphae, and yeasts with round morphology – the blastospores (Fig. 2A). In the OF (Fig. 2B) and MB-OF (Fig. 2C) groups, the biofilm exhibited flattened cells and a drastically reduced number of yeasts, which were smaller in the MB-OF group.

4. Discussion

Different methodologies can be designed to evaluate the antimicrobial action of pharmaceuticals on biofilms [8]. Thus, assessing a new photosensitizer, formulation, and/or drug delivery system for PDI may be a challenge. In this work, we used a range of assays to verify the PDI impact of an oral formulation containing MB. We noticed that methodologies may complement each other, and also that formulation substances may interfere with the results.

Here, we submitted *C. albicans* biofilm to MB-OF-mediated PDI. We used an OF with MB as the active compound, and SDS as a surfactant to reduce MB aggregation [12,13,32]. For this, the PDI group (0.005% MB-OF) was compared to either OF without photosensitizer or to CT with saline solution. The improvement of MB aggregation, promoted by its association to SDS in the OF, has been shown to be an effective alternative to potentiate PDI efficacy in vitro in planktonic *C. albicans* cultures [12]. However, the effects on biofilm needed further investigation.

The CFU/mL assay is the most widely used methodology to analyze the effect of antifungal strategies [25]. This technique allows the quantification of all viable cells, including the low metabolism ones, and excluding dead cells and debris [33]. However, CFU may have sub-counts in its quantification [34,35]. Indeed, the biofilm needs to be disorganized before dilutions, and the non-homogeneous disruption of biofilm, together with the serial dilutions, can bring strong variability to the data. Additionally, due to the method itself, sample collection occurs immediately after PDI, but the data may only be analyzed 24 h later, due to the time needed for colony growth. Using the CFU method, we could note that MB-OF was effective in reducing the viable cells of the biofilm immediately after PDI.

SEM was used to visualize the structure of the biofilm, to address possible morphological changes in the cells and the biofilm structure before and after treatment. However, this method mostly involves qualitative analysis. Indeed, we observed flattened and languished cells immediately following PDI, which corroborates the cell killing provided by PDI (around 95%). We also noticed surviving cells, which could regrow to keep the biolfim structure.

XTT data, collected at two different time points, confirmed this hypothesis. We observed no differences in cell metabolic activity immediately after PDI compared to the control, but increased metabolic activity was noted 24 h after PDI. These findings suggest that the surviving cells could be persister cells, whose behavior is not fully understood, even though their presence is associated with a biphasic killing of the yeast [36]. Indeed, yeast cells respond to stress, showing metabolic changes, and it is known that PDI action promotes pronounced oxidative stress.

Although the literature indicates that the XTT assay correlates with CFU/mL results [37,38], our study did not reproduce this finding. Our data matched that reported by Zago and collaborators, who suggested that CFU/mL and XTT analyses are complementary [33]. Furthermore, it is important to keep in mind the time point evaluated. Indeed, we observed the immediate effect of PDI by XTT, as well as the cell behavior after the strong oxidative stress promoted by PDI. Besides, both techniques, CFU/mL and XTT, could be used to evaluate the adherence inhibition, biofilm development inhibition, or biofilm disruption, depending on the PDI application during the time course of the biofilm formation (adherence – first 90 min, maturation – first 24 h, or mature biofilm – after 24 h) [39].

Bapat and colleagues suggested that the evaluation of XTT metabolic activity in PDI studies can show strong interference in optical density measurements since the photosensitizers absorb visible light [39]. This is completely relevant when evaluating PDI. However, in our study, the photosensitizer solution was removed before incubation in XTT; in this way, the effect was minimized. Besides, XTT absorption was measured at 492 nm, while MB absorbs light at higher wavelengths.

On the hand, data from the CV assay was strongly influenced by the OF. This assay is based on the detachment of adherent cells from the cell culture plates during cell death, with CV staining the remaining attached live cells. Our data showed an increased biomass immediately after PDI in both OF and MB-OF. This data was surprising, since other data showed a reduction in viable cells (CFU/mL) and also a reduced number of yeasts in the biofilm structure (SEM). Some hypotheses were raised regarding this result. First, the SDS contained at the OF interacted with CV, affecting the spectroscopic features. It has been shown previously that CV and SDS interact by forming ion-pairs, while CV is incorporated into the micellar surface at higher SDS concentrations [40]. These interactions affect the CV absorption spectra and molar absortivities, thus affecting the measurement. Second, since CV binds to negatively charged molecules, the SDS present at the OF could interact in some way, to the cell wall or extracellular matrix, and attract CV molecules to bind, increasing the total amount of bound CV, without a real increase in

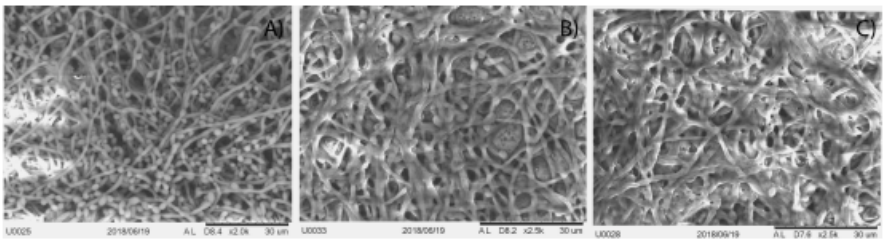


Fig. 2. Electron-micrographs of *C. albicans* biofilms treated by PDI. A) Control group (CT - physiological solution), B) oral formulation (OF), C) 0.005% methylene blue in oral formulation (MB–OF).

biomass. SDS is known to bind to proteins [41], thus reinforcing this hypothesis.

Filamentation is an important assay, since it allows identification of the ability to form hyphae, correlating it with virulence [33,42,43]. This is because the hyphae have a morphology that favors tissue penetration and the formation of a mature biofilm [26,44,45]. In addition, this morphology avoids the mechanism of death by host phagocytic cells. Phagocytosis induces the transition from yeast to hyphae, in which the cell can perforate the macrophage membrane. After lysis and death of the macrophages, *C. albicans* can evade the host's immune defenses [26, 44–46]. Our data showed that MB-OF mediated PDI was able to reduce virulence due to the smaller capacity of hyphae formation. This reduction was observed by filamentation assay but not in the SEM images. However, it is noteworthy that the hyphae were already present in the biofilm structure submitted to PDI in the SEM images, while yeasts were induced to hyphae transition in the filamentation assay.

This work highlights the importance of using different methodologies to assess the PDI. Furthermore, the use of formulations, nanoparticles, liposomes, and other drug delivery systems increases the complexity of the technique and can bring unexpected results. It is essential to gather data from various methodologies and also from different moments to obtain a complete understanding and to advance the use of PDI in mainstream medicine.

5. Conclusion

Understanding the therapeutic potential of new photosensitizers and/or formulations/drug delivery systems for PDI is challenging. Various methods are known; however, isolated assays may not bring conclusive information due to the possibility of an interaction between the photosensitizer or formulation components and the assay. The evaluated time point is also essential. In this study, we noticed that MB-OF-mediated PDI significantly reduced CFU/mL and decreased virulence, even though the surviving yeast cells presented higher mitochondrial metabolic activity after 24 h, in an attempt to regrow biofilm. This could be indicative of the need for extra and/or multiple applications of this therapy. In contrast, CV data were inconclusive, since the SDS present in the OF interacted with CV, making the data useless. Taken together, our data suggest that the association of different methods allows complementary responses to the assessment of the impact of PDI on biofilms.

Declarations of interest

None

Funding

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support of this research (Grant Numbers 2016/03037–0); CP thanks CNPq for the Research Fellowship (311737/2017–0 and 304829/2020–0); FF thanks CNPq for the Fellowship (152611/2018–5).

References

[1] Z. Xu, K. Wang, D. Min, T. Soteyome, H. Lan, W. Hong, F. Peng, X. Fu, G. Peng, T. Huang, J. Liu, B.V. Kjellerup, Regulatory network controls microbial biofilm development, with Candida albicans as a representative: from adhesion to dispersal, Bioengineered 13 (2022) 253–267. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996747.

[2] T. Atriwal, K. Azeem, F.M. Husain, A. Hussain, M.N. Khan, M.F. Alajmi, M. Abid, Mechanistic Understanding of Candida albicans Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition, Front. Microbiol. 12 (2021), 638609, https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638609.

[3] World Health Organization, Global Action plan on antimicrobial resistance. World Heal, Organ., 2015, pp. 1–28. https://ahpsr.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance.

[4] M.W. McCarthy, T.J. Walsh, Drugs currently under investigation for the treatment of invasive candidiasis, Expert Opin. Investig. Drugs. 26 (2017) 825–831, https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1341488.

[5] Y.-H. Hsieh, J.-H. Zhang, W.-C. Chuang, K.-H. Yu, X.-B. Huang, Y.-C. Lee, C.-I. Lee, An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on Candida albicans, Int. J. Mol. Sci. 19 (2018) 337, https://doi.org/10.3390/ijms19020337.

[6] S.M.S. Ng, Y.Y.A. Yap, J.W.D. Cheong, F.M. Ng, Q.Y. Lau, T. Barkham, J.W.P. Teo, J. Hill, C.S.B. Chia, Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant Candida albicans, J. Pept. Sci. 23 (2017) 215–221, https://doi.org/10.1002/psc.2970.

[7] T. Ohshima, S. Ikawa, K. Kitano, N. Maeda, A proposal of remedies for oral diseases caused by Candida: a mini review, Front. Microbiol. 9 (2018) 1–7, https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01522.

[8] L. Černáková, C. Light, B. Salehi, C. Rogel-Castillo, M. Victoriano, M. Martorell, J. Sharifi-Rad, N. Martins, C.F. Rodrigues, Novel Therapies for Biofilm-Based Candida spp. Infections, Adv. Exp. Med. Biol. 1214 (2019) 93–123, https://doi.org/10.1007/5584_2019_400.

[9] F. Freire, C. Ferraresi, A.J. AO, M. Hamblin, Photodynamic therapy of oral Candida infection in a mouse model, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 14 (2016) 111–114.

[10] L. Černáková, S. Dižová, H. Bujdáková, Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by Candida albicans strain resistant to fluconazole, Med. Mycol. 55 (2017) 748–753, https://doi.org/10.1093/mmy/myw137.

[11] L.R. Ferreira, A.S. Sousa, L.H. Alvarenga, Alessandro Melo Deana, M.E.O.S. de Santi, I.T. Kato, C.R.L. Leal, M.S. Ribeiro, R.A. Prates, Antimicrobial photodynamic therapy on Candida albicans pre-treated by fluconazole delayed yeast inactivation, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 15 (2016) 25–27.

[12] G. Alves da Collina, F. Freire, V. da Silva Barbosa, C. Bento Correa, H. Reis Nascimento, A.C.A.C. Ratto Tempestini Horliana, D.D.F.D. de F. Teixeira da Silva, R. Araujo Prates, C. Pavani, Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic Candida albicans is increased in sodium dodecyl sulfate, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 29 (2020), 101612, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101612.

[13] G.A. Da Collina, F. Freire, T.P. da C. Santos, N.G. Sobrinho, S. Aquino, R.A. Prates, D. de F.T. Da Silva, A.C.R. Tempestini Horliana, C. Pavani, Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat Candida albicans infections using photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. Sci. 17 (2018) 1355–1364, https://doi.org/10.1039/C8PP00238J.

[14] A. Jan, C. Liu, H. Deng, J. Li, W. Ma, X. Zeng, Y. Ji, In vitro photodynamic inactivation effects of hypocrellin B on azole-sensitive and resistant Candida albicans, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 27 (2019) 419–427, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.014.

[15] M.P. Rocha, A.L.M. Ruela, L.P. Rosa, G.P.O. Santos, F.C.S. Rosa, Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 32 (2020), 101962, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101962.

[16] M.S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A.A. Ghogare, A. Greer, M.R. Hamblin, C. Lorente, S.C. Nunez, M.S. Ribeiro, A.H. Thomas, M. Vignoni, T.M. Yoshimura, Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: guidelines and Mechanistic Pathways, Photochem. Photobiol 93 (2017) 912–919, https://doi.org/10.1111/php.12716.

[17] J. Ma, H. Shi, H. Sun, J. Li, Y. Bai, Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on Candida albicans biofilms in vitro, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 27 (2019) 280–287, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.06.015.

[18] Aline Silva Sousa, R.A. Prates, M.E.S.O. de Santi, R.G. Lopes, S.K. Bussadori, L. R. Ferreira, A.M. Deana, Photodynamic inactivation of Candida albicans biofilm: influence of the radiant energy and photosensitizer charge, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 14 (2016) 111–114.

[19] T. Voit, F. Cieplik, J. Regensburger, K.A. Hiller, A. Gollmer, W. Buchalla, T. Maisch, Spatial Distribution of a Porphyrin-Based Photosensitizer Reveals Mechanism of Photodynamic Inactivation of Candida albicans, Front. Med. 8 (2021) 1–9, https://doi.org/10.3389/fmed.2021.641244.

[20] I. Maliszewska, D. Wawrzyńczyk, E. Wanarska, The effect of glucose and human serum on 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic inactivation of Candida albicans, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 29 (2020), 101623, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101623.

[21] P. Pan, D. Svirskis, S.W.P. Rees, D. Barker, G.I.N. Waterhouse, Z. Wu, Photosensitive drug delivery systems for cancer therapy: mechanisms and applications, J. Control. Release. 338 (2021) 446–461, https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.08.053.

[22] G.M.F. Calixto, S.R. de Annunzio, F.D. Victorelli, M.L. Frade, P.S. Ferreira, M. Chorilli, C.R. Fontana, Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review, AAPS PharmSciTech 20 (2019), https://doi.org/10.1208/s12249-019-1407-y.

[23] J. Rak, P. Pouckova, J. Benes, D. Vetvicka, Drug delivery systems for phthalocyanines for photodynamic therapy, Anticancer Res 39 (2019) 3323–3339, https://doi.org/10.21873/anticanres.13475.

[24] W.J. da Silva, J. Seneviratne, N. Parahitiyawa, E.A.R. Rosa, L.P. Samaranayake, A. A. del Bel Cury, Improvement of XTT assay performance for studies involving Candida albicans biofilms, Braz. Dent. J. 19 (2008) 364–369, https://doi.org/10.1590/S0103-64402008000400014.

[25] A.C.B.P. Costa, C.A. Pereira, F. Freire, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of Candida biofilms formed in vitro, Mycoses 56 (2013) 614–622, https://doi.org/10.1111/myc.12092.

[26] P.P. de Barros, F. Freire, R.D. Rossoni, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge, Candida krusei and Candida glabrata reduce the filamentation of Candida albicans by downregulating expression of HWP1 gene, Folia Microbiol. (Praha). 62 (2017) 317–323, https://doi.org/10.1007/s12223-017-0500-4.
[27] M.W.D. Raas, T.P. Silva, J.C.O. Freitas, L.M. Campos, R.L. Fabri, R.C.N. Melo, Whole slide imaging is a high-throughput method to assess Candida biofilm formation, Microbiol. Res. 250 (2021), 126806, https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126806.
[28] A. Baptista, C. Sabino, S. Nunez, W. Miyakawa, A. Martin, M. Ribeiro, Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of Candida albicans, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 177 (2017) 76–84.
[29] B.D. Jett, K.L. Hatter, M.M. Huycke, M.S. Gilmore, Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria, BioTechniques 23 (1997) 648–650.
[30] J.O. Barbosa, R.D. Rossoni, S.F.G. Vilela, J.A. De Alvarenga, M.D.S. Velloso, M. C. De Azevedo Prata, A.O.C. Jorge, J.C. Junqueira, Streptococcus mutans can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of Candida Albicans, PLoS ONE 11 (2016) 1–16, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150457.
[31] L.C. Suzuki, I.T. Kato, R.A. Prates, C.P. Sabino, T.M. Yoshimura, T.O. Silva, M. S. Ribeiro, Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of Candida albicans in biofilms, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 17 (2017) 173–179, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.003.
[32] H.C.C. Junqueira, D. Severino, L.G.G. Dias, M.S.S. Gugliotti, M.S.S. Baptista, Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 2320–2328, https://doi.org/10.1039/b109753a.
[33] C.E. Zago, S. Silva, P.V. Sanitá, P.A. Barbugli, C.M.I. Dias, V.B. Lordello, C. E. Vergani, Dynamics of biofilm formation and the Interaction between Candida albicans and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant Staphylococcus aureus (MRSA), PLoS ONE 10 (2015) 1–15, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123206.
[34] L. Li, N. Mendis, H. Trigui, J.D. Oliver, S.P. Faucher, The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens, Front. Microbiol. 5 (2014), https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258, 1–1.
[35] B. Divol, A. Lonvaud-Funel, Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine, J. Appl. Microbiol. 99 (2005) 85–93, https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02578.x.
[36] M.B. Lohse, M. Gulati, A.D. Johnson, C.J. Nobile, Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms, Nat. Rev. Microbiol. 16 (2018) 19–31, https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107.Development.
[37] E.B. Moffa, F.E. Izumida, M.C.M. Mussi, W.L. Siqueira, J.H. Jorge, Interaction between XTT Assay and Candida Albicans or Streptococcus Mutans Viability, J. Int. Oral Heal. 8 (2016) 12–16.
[38] J.D. dos SANTOS, E. PIVA, S.F.G. VILELA, A.O.C. JORGE, J.C. JUNQUEIRA, Mixed biofilms formed by C. albicans and non-albicans species: a study of microbial interactions, Braz. Oral Res. 30 (2016) 1–8, https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0023.
[39] P. Bapat, G. Singh, C.J. Nobile, Visible lights combined with photosensitizing compounds are effective against candida albicans biofilms, Microorganisms 9 (2021) 1–20, https://doi.org/10.3390/microorganisms9030500.
[40] L. García-Río, P. Hervella, J.C. Mejuto, M. Parajó, Spectroscopic and kinetic investigation of the interaction between crystal violet and sodium dodecylsulfate, Chem. Phys. 335 (2007) 164–176, https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2007.04.006.
[41] R. Pitt-Rivers, F.S. Impiombato, The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins, Biochem. J. 109 (1968) 825–830, https://doi.org/10.1042/bj1090825.
[42] R.D. Rossoni, M. dos Santos Velloso, L.M.A. Figueiredo, C.P. Martins, A.O.C. Jorge, J.C. Junqueira, Clinical strains of Lactobacillus reduce the filamentation of Candida albicans and protect Galleria mellonella against experimental candidiasis, Folia Microbiol. (Praha). 63 (2018) 307–314, https://doi.org/10.1007/s12223-017-0569-9.
[43] N. Sá, P. Barros, J. Junqueira, A. Valério, C. Lino, R. Oliveira, C. Rosa, S. Johann, Antivirulence activity and in vivo efficacy of a thiazole derivative against candidiasis, J Mycol Med 31 (2021), 101134, https://doi.org/10.1016/j.mycmed.
[44] M.A. Sherwani, S. Tufail, A.A. Khan, M. Owais, Gold nanoparticle-photosensitizer conjugate based photodynamic inactivation of biofilm producing cells: potential for treatment of C. albicans infection in BALB/c mice, PLoS ONE 10 (2015) 1–20, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131684.
[45] C. Tsui, E.F. Kong, M.A. Jabra-Rizk, Pathogenesis of Candida albicans biofilm, Pathog. Dis 74 (2016), https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018 ftw018.
[46] H. Chen, X. Zhou, B. Ren, L. Cheng, The regulation of hyphae growth in Candida albicans, Virulence 11 (2020) 337–348, https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930.

Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103583. Acesso em 31/05/2023.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 42 (2023) 103583

Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt

The combination of methylene blue and sodium dodecyl sulfate enhances the antimicrobial photodynamic therapy of Candida albicans at lower light parameters

José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves, Carolina Montovam Monteiro, Gabriela Benedito Machado, Christiane Pavani *

Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, Rua Vergueiro 235-249, São Paulo 01504-001, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
Photochemotherapy
Antimicrobial photodynamic therapy
Aggregation
Fluence
Energy density

ABSTRACT

Background: The growth of resistant microorganisms has been a challenge for health systems. Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) has gained attention due to its effects on resistant strains. Recently, it was shown that the association of methylene blue (MB) and sodium dodecyl sulfate (SDS) are an effective strategy to increase the effect of aPDT; however, it is unknown which are the best light parameters (such as irradiance and radiant exposure, RE), to reach the most effective protocols. This work aimed to evaluate the light parameters, irradiance, and radiant exposure, in aPDT with MB when conveyed in water compared to MB associated with SDS.

Methods: Tests were carried out to quantify the colony-forming units (CFU) of ATCC 10,231 strain of *Candida albicans* when using MB in different media and with different light parameters: Control (water), SDS (0.25%), MB (20 mg/mL), and the MB/SDS at irradiances of 3.7; 11.2; 18.6, and 26.1 mW/cm^2 and varied irradiation times to reach radiant exposures of 4.4; 17.8; 26.7, and 44 J/cm^2.

Results: The results showed that aPDT with MB/SDS had a higher antimicrobial effect than MB when conveyed in water. Furthermore, for the highest irradiance studied (26.1 mW/cm^2), CFU decreases exponentially with increasing RE from 4.4 up to 44 J/cm^2. Similarly, at a fixed RE, the higher the irradiance used, the higher the antimicrobial effect was observed, except for the lowest RE studied (4.4 J/cm^2).

Conclusions: aPDT with MB/SDS had a greater antimicrobial action at the lower light parameters when compared to MB conveyed in water. The authors suggest the use of RE above 18 J/cm^2 and irradiance above 26 mW/cm^2 since at the mentioned parameters the increase in its value caused a greater antimicrobial effect.

1. Introduction

The increased levels of antibiotic resistance and the growing number of infections hard or impossible to treat has brought tackling antibiotic resistance as the main priority for the World Health Organization [1,2]. The antimicrobial consumption and the frequency of resistance among high-priority pathogens have been methods of monitoring the risks and the emerging resistance. In this sense, antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has gained attention due to its broad-spectrum activity and the absence of selection of microbial-resistant strains [3–7].

The antimicrobial effect of aPDT is based upon the generation of a burst of oxidative species, after the light activation of a photosensitizer. One of the most studied photosensitizers is methylene blue (MB), due to its low cost and high effectivity [5,8–14]. Unfortunately, the aPDT clinical studies with MB are not always related to strong antimicrobial effect as seen *in vitro (yeast/biofilm inactivation)*, while the clinical outcomes are mild [15–17]. The media in which MB is conveyed may induce self-association (H-aggregates formation) and affect the absorption spectra (a property called metachromacy), and/or the use is associated with the presence of body fluids such as salive or exudate, affecting the photodynamic action.

Some groups have already reported the optical and photochemical effects of the combination of MB and sodium dodecyl sulfate (SDS) [18–21]. Recently, this group has shown that MB-SDS presented an

* Corresponding author.
E-mail address: chrispavani@gmail.com (C. Pavani).

https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103583
Received 28 November 2022; Received in revised form 7 April 2023; Accepted 21 April 2023
Available online 22 April 2023
1572-1000/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

improved action of aPDT [22–26]. However, it is still not known which are the best light parameters (such as irradiance and radiant exposure - RE), to reach the most effective protocols.

In general, there is a divergence on the best parameters to be applied in aPDT with MB. For example, Queiroga et al. [27] activated MB solutions at 150 mg/L with an irradiance of 1000 mW/cm^2, a RE of 60 to 180 J/cm^2, and 660 nm for different *Candida ssp.* strains inactivation. Sousa et al. [28] while using the same concentration of MB, applied 3300 W/cm^2 and 426 J/cm^2 also at 660 nm, for *Candida albicans* ATCC 10,231. In contrast, Sabino et al. [11] worked with MB 100 μM (which is equivalent to 32 mg/L) at 100 mW/cm^2 and 660 nm, finding a reduction in the number of CFU/mL of 3.0 log at 25 J/cm^2 for *Candida albicans* ATCC 90,028. Additionally, Souza et al. evaluated a 660 nm, 92 mW/cm^2 laser at different REs (15.8; 26.3 and 39.5 J/cm^2) for the antimicrobial photodynamic action of MB in *Candida albicans* (ATCC 18, 804) and noticed that the increase in RE increased the degree of the microbial reduction [29]. The literature has shown that the best parameters for an effctive antmicrobial effect of aPDT depend on some factors, such as the photosensitizing substance used [30], the medium in which PS is conveyed [22,23], ligh parameters used [9], the growth phase [31,32] and the organization (planktonic or biofilm) [22,33].

This work aimed to evaluate the light parameters (irradiance and RE) of aPDT with MB when conveyed in water compared with MB associated with SDS.

2. Material and methods

CHEMICALS: Phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.2 was prepared from salts that were acquired from Synth, Diadema, Brazil. Sodium dodecyl sulfate was purchased from Sigma-Aldrich and a stock solution in sterile Milli-Q® water at 5% was prepared. Methylene Blue was acquired from Sigma-Aldrich and this was used as received. MB stock solutions of 1 mg/mL were prepared in water at neutral pH and kept in the dark, at room temperature (25 °C), for no longer than 3 months before use. The MB degradation at neutral pH was negligible for short time period [34], however for longer periods the stability was not evaluated. Sabouraud Dextrose agar was purchased from Kasvi (Curitiba, Brazil).

For the experiments, 400 μL of this MB stock solution was diluted in 9.6 mL of Milli-Q® sterile water or 1.0 mL of the SDS stock solution plus 8.6 mL of Milli-Q® sterile water. The final concentrations used (MB 20 mg/L; SDS 0.25%) were based on a previous study by this group [22].

The LED-Box (BioLambda, São Paulo, Brazil) is a LED cluster device comprising 100 high-power LED units emitting at 660 ± 10 nm inside a light homogenizing chamber with mirror walls, and a light diffuser ultra-clear glass which results in beam homogeneity of above 90% in the delivery of 50 mW/cm^2 maximum. This equipment was used to perform top irradiation at the plates that were inserted into a dark chamber (also part of the equipment), completely black with an aperture for adapting the light source on the top and another to open temporarily to introduce the plates at the chamber. The samples were irradiated simultaneously at 48-well polystyrene plates with cover and around 20% transmission losses occurs due to light absorption of the material at the light source wavelength [35]. The parameters used for this work were presented in Table 1, and the equipment was calibrated by the manufacturer on April 2022.

2.1. Yeast suspension

The *Candida albicans* yeast (ATCC 10,231) was cultured for 48 h at 37 °C on Sabouraud Dextrose Agar (Kasvi, Curitiba-Brazil). The microorganism was harvested and transferred to a test tube containing 10 mL of Milli-Q® sterile water. After vigorous mixing, 20 μL was removed and added to a conical tube containing 1.5 mL of Milli-Q® sterile water and 10 μL of Trypan blue (Sigma-Aldrich, Sant Louis-USA). The number of cells was counted when using a Neubauer Chamber and diluted to reach 5.0 × 10^7 cells/mL of a standard suspension [22].

Table 1
Parameters used for aPDT.

Parameter	Value	
Central Wavelength (nm)	660	
Spectral Width (nm)	20	
Operation Mode	Continuous	
Irradiated Area (cm^2)	163	
Pre-irradiation Time (min)	5	
Maximum Irradiance (mW/cm^2)	37.3	
Maximum Power (mW)	6080	
Irradiance (mW/cm^2)	Radiant Exposure (J/cm^2)	Irradiation Time
3.70	4.40	19 min 49s
3.70	17.8	80 min 11s
3.70	26.7	120 min 16s
3.70	44.0	198 min 11s
11.2	4.40	6 min 37s
11.2	17.8	27 min
11.2	26.7	39 min 44s
11.2	44.0	65 min 29s
18.6	4.40	3 min 57s
18.6	17.8	15 min 57s
18.6	26.7	23 min 55s
18.6	44.0	39 min 25s
26.1	4.40	2 min 48s
26.1	17.8	11 min 22s
26.1	26.7	17 min 3s
26.1	44.0	28 min 6s

2.2. Photodynamic assays

In 48-well flat-base hydrophobic surface microplates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), 0.20 mL of suspensions of *C. albicans* at 5.0 × 10^7 cells/mL and 0.20 mL of the testing solutions (Control - CT: water, SDS: 0.25% SDS in water solution, MB: 20 mg/L MB in water, MB-SDS: MB 20 mg/L and 0.25% SDS) were added to the wells and kept for 5 min in the dark and at room temperature, according to a protocol that was previously designed [22].

Each plate was prepared with a triplicate set of each of the four test solutions, i.e., 12 wells in total. To evaluate both the effect of aPDT on different RE and different irradiances, the irradiance was fixed at 3.7, 11.2, 18.6, or 26.1 mW/cm^2, and the irradiation time was changed to reach REs of 4.4, 17.8, 26.7, and 44.0 J/cm^2 (Table 1). Each of these 16 different experimental conditions was tested in three independent irradiations, giving a net $n = 9$ for each solution.

At the end of irradiation, an aliquot of each sample was withdrawn and serial dilutions were performed (10^{-1} to 10^{-5}) in PBS. After that, 20 μL of each dilution was seeded in lines into Petri dishes, with Sabouraud Agar Dextrose culture medium (Kasvi, Curitiba-Brazil). After 24 h incubation at 37 °C, the number of colony-forming units per mL (CFU/mL) was counted.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with OriginPro, Version 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Since the CFU data was used in a logarithm scale, the data distribution was considered parametric and the values were expressed as mean and standard deviation. For inferential analysis, the data were submitted to the two-way analysis of variance test (Two-Way ANOVA), followed by the Bonferroni post-test, for a comparison between the treatment groups and between the different light parameters. Confidence levels were adjusted to 95% ($p<0.05$).

3. Results

Fig. 1 presents the increase in radiant exposure at different irradiances (Fig 1A: 3.7 mW/cm^2; Fig 1B: 11.2 mW/cm^2; Fig 1C: 18.6 mW/cm^2 and Fig 1D: 26.1 mW/cm^2). At irradiances of 3.7, 11.2, and 18.6

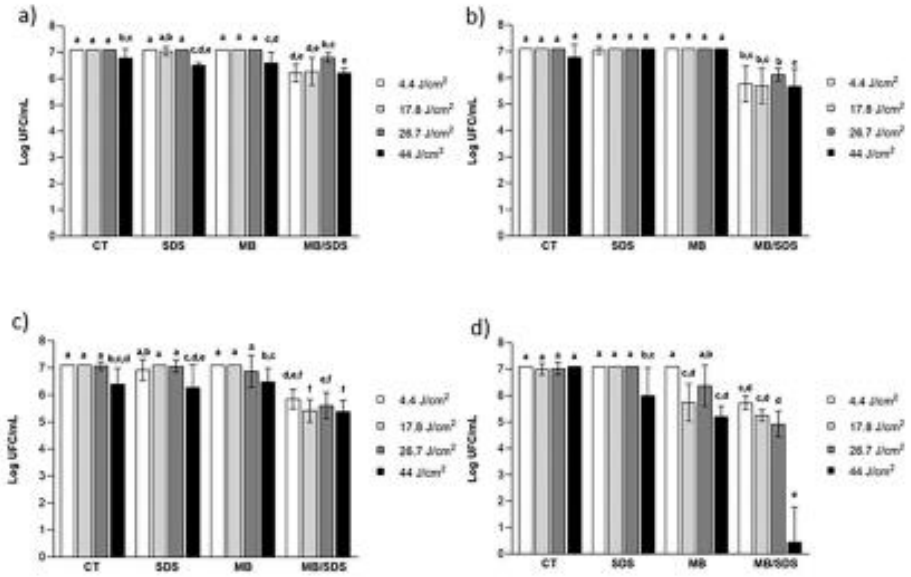


Fig. 1. The antimicrobial effect of MB / SDS is correlated with RE at higher irradiances. C. albicans suspensions were treated with water (CT); SDS at 0.25% (SDS); 20 mg/L MB water solution (MB), or 20 mg/L MB in 0.25% SDS solution (MB/SDS). Irradiation was performed at a) 3.7 mW/cm2; b) 11.2 mW/cm2; c) 18.6 mW/cm2; d) 26.1 mW/cm2. The bars with the same letter code (a, b, c, d, e) are not statistically different from each other ($p>0.05$).

mW/cm^2 (presented at Fig 1A, B and C, respectively), there were no changes in the number of CFU/mL in the SDS, and the MB groups concerning the CT group were it was kept constant at 7.0 log CFU/mL, for the 4.4, 17.8, and 26.7 J/cm^2 REs. At 44 J/cm^2, the results varied as a function of irradiance.

First, at 44 J/cm^2 and 3.7 mW/cm^2 (Fig 1A), there was a reduction of 0.6 log in the number of CFU/mL in CT group when compared to CT at other REs and this reduction was related to the high irradiation time, above 3 h, in which the inoculum was present in the water; however no difference was observed in the SDS and MB groups when compared with

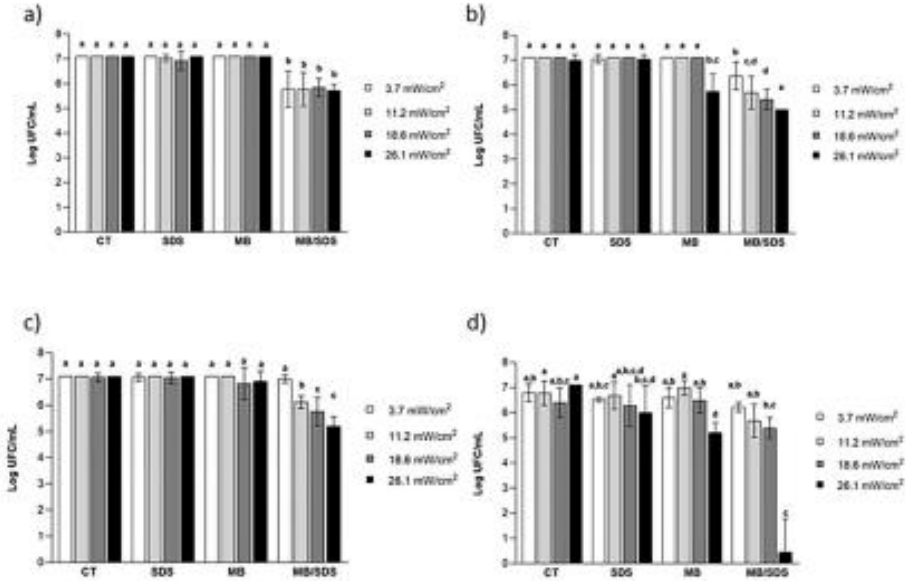


Fig. 2. The antimicrobial effect of MB/SDS is correlated with irradiance, except for low RE. C. albicans suspensions were treated with water (CT); SDS at 0.25% (SDS); 20 mg/L MB water solution (MB), or 20 mg/L MB in 0.25% SDS solution (MB/SDS). Irradiation was performed at a) 4.4 J/cm2; b) 17.8 J/cm2; c) 26.7 J/cm2; d) 44 J/cm2. The bars with the same letter code (a, b, c, d, e) are not statistically different from each other ($p>0.05$).

the CT group. Second, at 44 J/cm^2 and 11.2 mW/cm^2 (Fig 1B), no reduction in MB or SDS was found compared to CT while at 44 J/cm^2 and 18.6 mW/cm^2 (Fig 1C) no differences were observed in the SDS and MB groups compared to CT; however there was a reduction of approximately 0.7 log in the number of CFU/mL in the CT, SDS and MB groups when it concerns the CT group in other REs. These reduction/differences were calculated based upon the subtraction of the average logarithm values of CFU/mL obtained per group. Finally, at 26.1 mW/cm^2 (Fig. 1D), at 4.4, 17.8, and 26.7 J/cm^2, there was no change in the number of CFU/mL in the SDS groups to the CT group, which was kept constant at around 7 log CFU/mL. In the RE of 44 J/cm^2, there was a reduction of approximately 1 log in the number of CFU/mL in the SDS compared to the CT group. In the MB group, no antimicrobial effect was observed in the REs of 4.4 and 26.7 J/cm^2, while at 17.8 and 44 J/cm^2, a reduction of 1.6 log CFU/mL was observed in comparison to CT.

For the MB/SDS groups, when the irradiances of 3.7 (Fig 1A), 11.2 (Fig 1B) and, 18.6 mW/cm^2 (Fig 1C) were used, there was a 0.6, 1.2, and 1.5 log CFU/mL reduction when compared to CT at all REs evaluated (4.4; 17.8; 26.7 and 44 J/cm^2). Still, at 26.1 mW/cm^2 (Fig 1D) in the MB/SDS group, there was a reduction in the log CFU/mL values, proportional to the RE used: reductions of 1.37, 1.85, 2.18 and 6.66 log CFU/mL were found when compared to CT, at 4.4, 17.8, 26.7 and 44 J/cm^2, respectively.

On the other hand, Fig. 2 presents the increase in irradiance at different radiant exposures (Fig 2A: 4.4 J/cm^2; Fig 2B: 11.2 J/cm^2; Fig 2C: 26.7 J/cm^2 and Fig 3D: 44 mW/cm^2). At a fixed RE of 4.4, 17.8, and 26.7 J/cm^2 (Figs 2A–C, respectively) and with a varying irradiance, no reduction in the number of CFU/mL was found in the SDS and MB groups with respect to the CT group. At 44 J/cm^2 (Fig 2D) there was no change in the number of CFU/mL in the SDS groups when compared with the CT groups when being kept constant at 6.8 log CFU/mL for the three smaller irradiance values (3.7; 11.2; and 18.6 mW/cm^2), while at 26.1 mW/cm^2, a reduction of approximately 1 log CFU/mL was observed. A similar effect was observed in the MB group: with no changes in the number of CFU/mL values when compared to the CT group, being the values kept constant at 6.8 log CFU/mL when the three smaller irradiance values studied were used (3.7; 11.2; and 18.6 mW/cm^2); while at 26.1 mW/cm^2, a reduction of 1.9 log CFU/mL was observed in the MB when compared to the CT.

Finally, for the combination of MB and SDS, at 4.4 J/cm^2 (Fig 2A), there was a reduction of approximately 1.5 log CFU/mL compared to CT at all of the evaluated irradiances, showing aPDT effect independent of irradiance in this group. For 17.8 J/cm^2 (Fig 2B) in the MB/SDS group, there was a reduction in the log CFU/mL values, which were proportional to the irradiance used, greater at 26.1 mW/cm^2 (2.4 log CFU/mL), intermediate at 18.6 (1.7 log CFU/mL) and 11.2 mW/cm^2 (1.4 log CFU/mL), and smaller at 3.7 mW/cm^2 (0.8 log CFU/mL). Similar effects were observed for both 26.7 and 44 J/cm^2 (Figs. 2C and 2D). At 26.7 J/cm^2 in the MB/SDS group, there was a reduction in the log CFU/mL values, proportional to the irradiance used, and no antimicrobial effect was observed at 3.7 mW/cm^2, with a reduction of 1 log CFU/mL at 11.2 mW/cm^2, and a reduction of approximately 1.8 log CFU/mL at 18.6 and 26.1 mW/cm^2, respectively, being statistically equal. In addition, at 44 J/cm^2 in the MB/SDS group, no difference was found in the values of log CFU/mL concerning the CT group when 3.7 mW/cm^2 was used, and at 11.2 mW/cm^2, there was a 1.4 log CFU/mL reduction, at 18.6 mW/cm^2, there was a reduction of 1.7 log CFU/mL, while at 26.1 mW/cm^2 there was a reduction of 6.7 log CFU/mL.

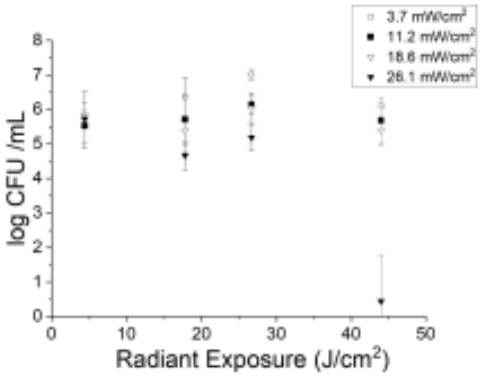


Fig. 3. The antimicrobial effect of MB/SDS at different REs and irradiances. 20 mg/L MB in a 0.25% SDS solution (MB/SDS).

In order to establish the dependence between the antimicrobial effect and the light parameters (RE and irradiance) the graph presented at Fig. 3 was prepared. At 4.4 J/cm^2 the log UFC/mL values were similar, with respect to irradiance. Both at 17.8 and 26.7 J/cm^2, the log UFC/mL values slightly decrease as the irradiance increases. Finally, at 44 J/cm^2, the logarithmic UFC/mL values strongly decrease as the irradiance increases.

4. Discussion

This work was the fourth in a series of manuscripts published by the group based on the association of phenothiazinium dyes (MB family) and SDS, showing an improved antimicrobial effect [22–24]. Since depending upon the media in which the photosensitizer is conveyed it may aggregate [19,20,36], these researchers have been shown that the association of phenothiazinium dyes and SDS (above the Critical Micellar Concentration - CMC), may control the dye aggregation, favoring the monomers and increasing the production of singlet oxygen. In SDS concentrations below CMC, i.e., premicellar region, MB forms dimers with SDS and reverses back to the monomer state at higher SDS concentrations (above CMC) [18–20].

The improved antimicrobial effect of this association was observed both in the planktonic and biofilm culture, however, the light dose needed further studies to optimize. Furthermore, the association may help the translation of the *in vitro* protocol into clinics, since the aPDT protocol was often ineffective when delivering aqueous MB probably due to the pH or ionic strength of the mouth, for example [36–38].

In this work, the authors verified that for the same combination of irradiance and the RE antimicrobial effect of MB-SDS aPDT was always higher than that of MB that was conveyed in water. However, the inactivation of the microorganism (which is a minimum reduction of 3 log in the number of CFU/mL) was achieved in the MB-SDS group but only at 26.1 mW/cm^2 and 44 J/cm^2. Sabino et al. [11] achieved a reduction of 3 logs when using 100 mW/cm^2 (3.8 times higher than the one used in this study) and 25 J/cm^2 (1.8 times lower than that used in this study). It should be noted that the final concentration of MB used in this work was 20 mg/L or 0.002%, and compared to Sabino's work, a concentration 2.4 times lower.

Similarly, Souza et al. [29] found a 2.71 log CFU/mL reduction in fungal count when using MB 100 mg/L in physiological solution (aqueous 0.85% NaCl), 39.5 J/cm^2 and 92 mW/cm^2, being a 5 times higher concentration of MB, similar RE and a 3.5 times higher irradiance when compared to MB-SDS treatment which resulted in a 6 log CFU/mL reduction at this work.

Given these results, it is worth emphasizing the importance of mentioning the medium in which the photosensitizer is conveyed in publications, especially for those compounds that undergo aggregation, since, depending on the medium used, the light parameters for an effective antimicrobial action are different. Queiroga et al. [27] used much higher irradiance and RE than those reported here (1000 mW/cm^2 and 60–180 J/cm^2), however, MB was used at 150 mg/L in saline solution, which means two conditions that favor the MB aggregation: medium with high ionic strength and high concentrations of MB [22, 39]. Due to these conditions that increase the amount or dimers, higher

light parameters, such as the irradiance and RE, were required to obtain an antimicrobial effect. Similarly, Sousa et al. [28] obtained *C.albicans* inactivation when using MB at 150 mg/L, while also in a saline solution, at 3300 mW/cm^2 and 426 J/cm^2. Similarly, Prates et al. [9] evaluated the antifungal effect of aPDT with MB when applied in a culture medium, using an irradiance of 100 mW/cm^2 and 300 mW/cm^2 at times of 3, 6, and 9 min of irradiation, conditioning the RE of (18 J /cm^2 up to 162 J/cm^2), reaching an inactivation after 6 and 9 min of irradiation at 300 mW/cm^2 (108 and 162 J/cm^2). However, the authors of the article mentioned an increase of 3 °C during 9 min of irradiation of yeast with MB at these irradiances.

The data obtained have shown that for the combination of 26.1 mW/cm^2 and 44 J/cm^2 there was a strong and significant antimicrobial effect, while in the other parameters used there was little or no antimicrobial action. Our interpretation of these results is that, at low irradiance levels, the production of oxidative species from MB photoactivation is low, so that the microorganism's antioxidant defenses are capable of managing the damage that has occurred to a certain extent. Furthermore, when a low irradiance is applied, a long exposure time, making the translation to clinical protocols difficult or unfeasible. Therefore, the data from this study suggest that the use of low irradiances (below 25 mW/cm^2) is not only impractical for clinical use but also ineffective.

On the other hand, at irradiance values of around 25 mW/cm^2, there was an intense and short period of the production of oxidant species, with oxidative stress that led to the death of the microorganism. Hence, for an effective antimicrobial action a minimum irradiance was required, which in clinical practice is an equipment-dependent parameter. The current study's data corroborated previous findings that showed that light parameters were critical factors for the antimicrobial effect of aPDT [30]. In this sense, for clinical applications the authors recommend the professionals to choose low-power lasers or LEDs with higher powers as the ones that have been recently developed [40–42] to overcome the challenge of the low irradiances.

It is suggested that the use of RE above 18 J/cm^2 and irradiance above 26 mW/cm^2 is necessary as in these cases, the increase in the light parameters induced a greater antimicrobial effect. However, no upper limits were established for these parameters. Thus it is not yet t it known how much increased aPDT effect would result from increasing these values before inducing significant heating or photobleaching effects.

Maliszewska et al. [40] when using a homemade LED device at 640 nm, 2.5–10 mW/cm2 irradiated the MB solutions in water (at unreported concentrations), and noted the existence of photobleaching by an second-order kinetics. Additionally, 57% MB discoloration was reported using 3.0 mW/cm^2 in 633 ± 15 nm for 16 h at a 10^{-}5 mol/L pH=4 MB solution [43]. In the present study, similar and higher irradiances (3.7; 11.2; 18.6 and 26.1 mW/cm^2) were used, however, the time was considerably shorter, being around 3 h the longest and 3 min the shortest. Furthermore, the MB concentration was different and the physiological pH was considered. Therefore, we exposed the solutions to 26.1 mW/cm^2 irradiance for 28 min and 6 s (44,0 J/cm^2) and it was observed that in the water solution, MB showed 17,0% (±3,30) discoloration while no discoloration was observed for MB in the presence of SDS (Fig. 4). MB is considered stable up to 16.25 J [44] and the photobleaching mechanism has not been associated with oxygen-related oxidation, however due to an excited state reaction.

Finally, it is worth mentioning that these parameters were determined in suspension for the association between MB and SDS but more complex microbial organizations, such as biofilms, as well as when used in patients, may require greater light parameters, requiring further studies.

5. Conclusion

The MB-SDS combination had greater antimicrobial action than MB applied in water at all the light parameters evaluated. Irradiances should be kept higher than 25 mW/cm^2 while RE above 18 J/cm^2 caused an antimicrobial effect, but around 44 J/cm^2 was more effective when aPDT was performed using MB-SDS as photosensitizer. Increasing the irradiance and RE values must be done with caution since the MB can be photobleached.

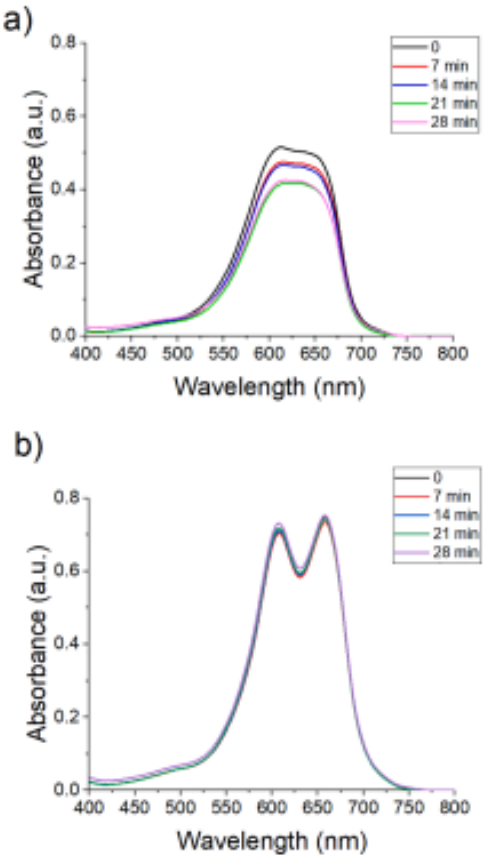


Fig. 4. MB photobleaching in (a) water; (b) SDS 0.25%. MB 20 mg/L Irradiation at 660 nm, 26.1 mW/cm2 and 44 J/cm2 (total irradiation 28 min and 6s).

CRediT authorship contribution statement

José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves: Writing – original draft, Visualization, Resources, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Carolina Montovam Monteiro:** Writing – original draft, Resources, Investigation, Funding acquisition. **Gabriela Benedito Machado:** Visualization, Resources, Investigation, Funding acquisition. **Christiane Pavani:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support of this research (Grant No 2016/

03037–0); CP thanks CNPq for the Research Fellowship (304829/2020–0). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; CMM and GBM thank CAPES for the fellowships.

References

[1] World Health Organization, Sixty-eight world health assembly (WHA68.7). Agenda item 15.1: Global action plan on antimicrobial resistance, 2015, 45. ISBN: 9789241509763. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763.

[2] World Health Organization, Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report, Geneva,2021, ISBN: 978 92 4 002733 6. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336.

[3] P.H.G. Barião, L. Tonani, G.T.P. Brancini, E. Nascimento, G.Ú.L. Braga, M. Wainwright, M.R. von Zeska Kress, *In vitro* and *in vivo* photodynamic efficacies of novel and conventional phenothiazinium photosensitizers against multidrug-resistant Candida auris, Photochem. Photobiol. Sci. 21 (2022) 1807–1818, https://doi.org/10.1007/s43630-022-00258-4.

[4] C. Song, F. Dai, Y. Ning, T. Deng, Y. Yang, H. Zhu, L. Song, Application of antimicrobial photodynamic therapy to treat subgingival multidrug-resistant bacterial infections in ICU patients, Photodiagnosis Photodyn. Ther. (2022), https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103176.

[5] C. Songsantiphap, J. Vanichanan, T. Chatsuwan, P. Auewarangpa, E. Boontaveeyuwat, Methylene blue–mediated antimicrobial photodynamic therapy against clinical isolates of extensively drug resistant gram-negative bacteria causing nosocomial infections in thailand, An *In Vitro* Study, Front. Cell. Infect. Microbiol. 12 (2022) 1–11, https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.929242.

[6] C.P. Sabino, M. Wainwright, M.S. Ribeiro, F.P. Sellera, C. dos Anjos, M. da S. Baptista, N. Lincopan, Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy, J. Photochem. Photobiol. 208 (2020) 1–9, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111893.

[7] F.P. Sellera, C.P. Sabino, S.C. Núñez, M.S. Ribeiro, Clinical acceptance of antimicrobial photodynamic therapy in the age of WHO global priority pathogens: so what we need to move forward? Photodiagnosis Photodyn. Ther. 40 (2022) https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103158.

[8] R.A. Belotto, M.C. Chavantes, J.P. Tardivo, R. Euzébio dos Santos, R.C. M. Fernandes, A.C.R.T. Horliana, C. Pavani, D.F. Teixeira da Silva, Therapeutic comparison between treatments for vulvar lichen sclerosus: study protocol of a randomized prospective and controlled trial, BMC Womens. Health 17 (2017), https://doi.org/10.1186/s12905-017-0414-y.

[9] R.A. Prates, E.G. Silva, A.M. Yamada, L.C. Suzuki, C.R. Paula, M.S. Ribeiro, Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner, Laser Phys. 19 (2009) 1038–1044, https://doi.org/10.1134/S1054660X09050284.

[10] L. Černáková, S. Dítoví, H. Bujdáková, Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by Candida albicans strain resistant to fluconazole, Med. Mycol. 55 (2017) 748–753, https://doi.org/10.1093/mmy/myw137.

[11] C.P. Sabino, M. Wainwright, C. dos Anjos, F.P. Sellera, M.S. Baptista, N. Lincopan, M.S. Ribeiro, Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 28 (2019) 186–191, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.022.

[12] T. Briggs, G. Blunn, S. Hislop, R. Ramalhete, C. Bagley, D. McKenna, M. Cosshup, Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections, Lasers Med. Sci. (2018), https://doi.org/10.1007/s10103-017-2304-4.

[13] Z.S. Silva, Y.Y. Huang, L.F. de Freitas, C.M. França, S.B. Botta, P.A. Ana, R. A. Mesquita-Ferrari, K.P. Santos Fernandes, A. Deana, C.R. Lima Leal, R.A. Prates, M.R. Hamblin, S.K. Bussadori, Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against Streptococcus mutans biofilms, Sci. Rep. 6 (2016) 33270, https://doi.org/10.1038/srep33270.

[14] K. Ogasawara, Candida albicans sterilization using a light-emitting diode and methylene blue, Laser Ther. 27 (2018) 257–263.

[15] M. Du, W. Xuan, X. Zhen, L. He, L. Luo, S. Yang, N. Wu, J. Qin, R. zhao, J. Qin, J. Lan, H. Lu, C. Liang, Y. Li, M.R. Hamblin, L. Huang, Antimicrobial photodynamic therapy for oral Candida infection in adult AIDS patients: a pilot clinical trial, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 34 (2021), 102310, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102310.

[16] N.G. Lima, R.M. Monteiro, C.P. Torres, A.E. de Souza-Gabriel, E. Watanabe, M. C. Borsatto, Influence of antimicrobial photodynamic therapy with different pre-irradiation times on children's dental biofilm: randomized clinical trial, Eur. Arch. Paediatr. Dent. 23 (2022) 897–904, https://doi.org/10.1007/s40368-022-00716-8.

[17] F. AlAhmari, H.B. Ahmed, A.A. Al-Kheraif, F. Javed, Z. Akram, Effectiveness of scaling and root planning with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis among cigarette-smokers and never-smokers: a randomized controlled clinical trial, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 25 (2019) 247–252, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.01.006.

[18] J. Wang, C.Y. Lin, C. Moore, A. Jhunjhunwala, J.V. Jokerst, Switchable photoacoustic intensity of methylene blue via sodium dodecyl sulfate micellization, Langmuir 34 (2018) 359–365.

[19] H.C.C. Junqueira, D. Severino, L.G.G. Dias, M.S.S. Gugliotti, M.S.S. Baptista, Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 2320–2328, https://doi.org/10.1039/b109753a.

[20] M.E. Carroll, M.A. Unger, A.M. Leach, M.J. Morris, C.M. Ingersoll, F.V. Bright, Interactions between methylene blue and sodium dodecyl sulfate in aqueous solution studied by molecular spectroscopy, Appl. Spectrosc. 53 (1999) 780–784, https://doi.org/10.1366/0003702991947568.

[21] P. Shah, N. Jha, A. Bhattarai, Physicochemical studies on the interaction between sodium dodecyl sulfate and methylene blue in methanol-water mixed solvent media, J. Chem. (2020), 5292385, https://doi.org/10.1155/2020/5292385.

[22] G.A. da Collins, F. Freire, T.P. da C. Santos, N.G. Sobrinho, S. Aquino, R.A. Prates, D. de F.T. da Silva, A.C.R. Tempestini Horliana, C. Pavani, Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat Candida albicans infections using photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. Sci. 17 (2018) 1355–1364, https://doi.org/10.2174/1567269053390257.

[23] G.A. Collins, F. Freire, V. da Silva Barbosa, C. Bento Correa, H. Reis Nascimento, A. C.A.C. Ratto Tempestini Horliana, D.D.F.D. de F. Teixeira da Silva, R. Araujo Prates, C. Pavani, Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic Candida albicans is increased in sodium dodecyl sulfate, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 29 (2020), 101612, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101612.

[24] G.A. da Collins, F.V. Cabral, C.M. Monteiro, G.B. Machado, J.M.L.A. Gonçalves, F. Freire, R.A. Prates, M.S. Ribeiro, C. Pavani, The importance of combining methods to assess Candida albicans biofilms following photodynamic inactivation, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 38 (2022) 1–6, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102769.

[25] C.M.L. Francisco, J.M.L.A. Gonçalves, B.S. Brum, T.P.C. Santos, A.L. Santos-Franco, D.F... Silva, C. Pavani, Phenothiazine photodynamic efficiency is aggregation dependent, New J. Chem. 41 (2017) 14438–14443.

[26] C.T. Kassa, L.T.C. Salviatto, A.C.T.K.S. Rosi-Lima, C.A. Damante, C. Pavani, A. Deana, I.T. Kato, M. Wainwright, R.A. Prates, Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue in surfactant vehicle as adjuvant to periodontal treatment. Randomized, controlled, double-blind clinical trial, Photodiagnosis Photodyn. Ther. (2022), 103194, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103194.

[27] A.S. Queiroga, V.N. Trajano, E.O. Lima, A.F.M. Ferreira, A.S. Queiroga, F. A. Limeira, *In vitro* photodynamic inactivation of Candida spp. by different doses of low power laser light, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 8 (2011) 332–336, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.08.005.

[28] J.N.L. de Sousa, B.H. de Queiroga, P. de O. Kocerginsky, P.H.C. Marinho, Â. T. Araki, Photoinactivation of Candida albicans using methylene blue as photosensitizer, RGO - Rev. Gaúcha Odontol. 63 (2015) 411–417, https://doi.org/10.1590/1981-86372015000300006.

[29] R.C. Souza, J.C.J. Jorge, R.D. Rossoni, C.A. Pereira, E. Munin, A.O.C. Jorge, 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. 25 (2010) 385–389.

[30] A. Tarazukiewicz, G. Sarwezyk, T. Sarna, K.P. Bielawski, J. Nakonieczna, Photodynamic inactivation of Candida albicans with imidazoacridinones: influence of irradiance, photosensitizer uptake and reactive oxygen species generation, PLoS One 10 (2015) 1–19, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129301.

[31] A. Baptista, C.P. Sabino, S.C. Núñez, A.A. Martin, M.S. Ribeiro, Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of Candida albicans, J. Photochem. Photobiol. B Biol. (2017) 76–84, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.013.

[32] A.A. Lamif, P.K. Mukherjee, J. Chandra, M.R. Roth, R. Welti, M. Rouabhia, M. A. Ghannoum, Lipidomics of Candida albicans biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation, Microbiology 157 (2011) 3232–3242, https://doi.org/10.1099/mic.0.051086-0.

[33] F. Freire, P.P. de Barros, D. da Silva Ávila, G.N.B. Brito, J.C. Junqueira, A.O. C. Jorge, Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of Candida albicans biofilms after photodynamic inactivation, Lasers Med. Sci. 30 (2015) 1511–1518, https://doi.org/10.1007/s10103-015-1747-0.

[34] T. Soltani, M.H. Entezari, Photolysis and photocatalysis of methylene blue by ferrite bismuth nanoparticles under sunlight irradiation, J. Mol. Catal. A Chem. 377 (2013) 197–203, https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.05.004.

[35] D.F.T. Silva, R.A. Mesquita-Ferrari, K.P.S. Fernandes, M.P. Raele, N.U. Wetter, A. M. Deana, Effective transmission of light for media culture, plates and tubes, Photochem. Photobiol. 88 (2012) 1211–1216, https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01166.x.

[36] M. Taj Muhammad, M.N. Khan, Study of electrolytic effect on the interaction between anionic surfactant and methylene blue using spectrophotometric and conductivity methods, J. Mol. Liq. 234 (2017) 309–314, https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.03.102.

[37] S. Dalvi, S. Benedicenti, S. Tudor, I.R. Bordea, Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of periodontitis : a systematic review and meta-analysis of in vivo human randomized controlled clinical trials, Pharmaceutics 13 (2021) 836.

[38] M.A. Meire, J.D. Bronzato, B.P.F.A. Gomes, R.A. Bomfim, Effectiveness of adjunct therapy for the treatment of apical periodontitis : a systematic review and meta- - analysis, Int. Endod. J. (2022) 1–20, https://doi.org/10.1111/iej.13838.

[39] C.M.L. Francisco, J.M.L.A. Gonçalves, B.S. Brum, T.P.C. Santos, A. Lino-Dos-Santos-Franco, D.F.T. Silva, C. Pavani, The photodynamic efficiency of phenothiazinium

dyes is aggregation dependent, New J. Chem. 41 (2017) 14438–14443, https://doi.org/10.1039/c7nj02172a.
[40] J.H. Cai, Q.S. Tian, X.Z. Zhu, Z.H. Qu, W. He, D.Y. Zhou, L.S. Liao, Robust laminated anode with an ultrathin titanium nitride layer for high-efficiency top-emitting organic light-emitting diodes, Molecules 27 (2022), https://doi.org/10.3390/molecules27175723.
[41] J. Hua, J. Li, Z. Zhan, Y. Chai, Z. Cheng, P. Li, H. Dong, J. Wang, High efficiency and low operating voltage yellow phosphorescent organic light-emitting diodes with a simple doping-free structure, RSC Adv. 12 (2022) 21932–21939, https://doi.org/10.1039/d2ra03617g.
[42] H. Liu, Y. Fu, B.Z. Tang, Z. Zhao, All-fluorescence white organic light-emitting diodes with record-beating power efficiencies over 130lm W−1 and small roll-offs, Nat. Commun. 13 (2022), https://doi.org/10.1038/s41467-022-32967-w.
[43] A. Sáenz-Trevizo, P. Pizá-Ruiz, D. Chávez-Flores, J. Ogaz-Parada, P. Amézaga-Madrid, A. Vega-Ríos, M. Miki-Yoshida, On the discoloration of methylene blue by visible light, J. Fluoresc. 29 (2019) 15–25.
[44] A. Gollmer, A. Felgenträger, W. Bäumler, T. Maisch, A. Späth, A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling - a structure-response study, Photochem. Photobiol. Sci. 14 (2015) 335–351, https://doi.org/10.1039/c4pp00309k.

Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103628. Acesso em 06/06/2023.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 42 (2023) 103628

Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt

Enhancing antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium dyes and sodium dodecyl sulfate against *Candida albicans* at various growth stages

Gabriela Benedito Machado, Carolina Montovam Monteiro, José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves, Christiane Pavani *

Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, Rua Vergueiro 235-249, São Paulo, SP 01504-001, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
Antimicrobial photodynamic therapy
Biofilm
Candida albicans
Sodium dodecyl sulfate
PDT

ABSTRACT

Background: The eradication of *C. albicans* is difficult due to the organization of the yeast in biofilms. Photodynamic therapy (PDT) has been proposed as an alternative to antifungals. Phenothiazinium dyes, e.g. methylene blue (MB), have been proposed as photosensitizing agents (PS), and their association with sodium dodecyl sulfate (SDS) has recently been shown to improve the effectiveness of PDT in planktonic culture. In this sense, the objective of this work was to evaluate the effect of PDT with phenothiazinium dyes associated to SDS in biofilms at the different stages of growth.

Methods: Experiments were carried out to evaluate the effects of PDT on biofilm formation and on established biofilms of *C. albicans* ATCC 10231. Samples were exposed to PS 50 mg/L (MB, Azure A – AA, Azure B - AB and dimethyl methylene blue - DMMB) dissolved in water or 0.25% SDS, for 5 min in the dark. After irradiation at 660 nm, 37.3mW/cm^2 for 27 min, 60.4J/cm^2 colony forming units count assay (CFU/mL) was performed. One or two irradiations were applied. Statistical methods were used to assess effectiveness.

Results: PSs showed low toxicity in the dark. An application of PDT irradiation was not able to reduce the CFU/mL both in mature biofilms (24h) and in biofilms in the dispersion phase (48h), only in the adherence phase did PDT prevent the formation of biofilms. With two successive applications of PDT irradiation in the dispersion phase, PDT with MB, AA, and DMMB completely inactivated *C. albicans*. The similar was not observed with mature biofilms.

Conclusions: Different stages of biofilm growth respond differently to PDT, with the greatest inhibitory effect found in the adhesion stage. Mature and dispersed biofilms are less susceptible to PDT. The use of two successive applications of PDT with PSs associated with SDS may be a useful approach to inactivate *C. albicans* biofilms.

1. Introduction

Candida albicans, a fungus commonly found in the human microbiota [1,2], can cause infections under certain conditions. Factors such as environmental changes (pH or nutritional alterations), antibiotic usage, and immune system disruptions can contribute to the proliferation of this fungus [3]. Biofilm formation enables *C. albicans* to evade antimicrobial treatments, as biofilms are complex structures composed of yeast, hyphae, and pseudohyphae embedded within an extracellular polysaccharide matrix. Once mature, biofilms exhibit high resistance to various antifungal agents, which poses significant challenges for effective treatment.

Biofilms can form on both biotic and abiotic surfaces [4]. The process begins with the adhesion of planktonic cells to the surface, followed by cell proliferation and the expression of genes responsible for the yeast-to-hyphae transition [2,5]. Subsequently, during the maturation phase, hyphae are formed, and an extracellular polysaccharide matrix develops, encompassing yeast, hyphae, and pseudohyphae. This matrix consists of proteins, carbohydrates, nucleic acids, and lipids, acting as a protective barrier against physical and chemical aggressions [2,4,6]. In

Abbreviations: PDT, Photodynamic Therapy; MB, Methylene Blue; AA, Azure A; AB, Azure B; DMMB, Dimethyl Methylene Blue; CFU, colony forming units; SDS, sodium dodecyl sulfate; PBS, phosphate buffer saline.

* Corresponding author.
E-mail addresses: chrispavani@uni9.pro.br, chrispavani@gmail.com (C. Pavani).

https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103628
Received 24 February 2023; Received in revised form 20 May 2023; Accepted 22 May 2023
Available online 23 May 2023
1572-1000/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

the dispersal phase, yeast cells are released from the biofilm into the surrounding environment, initiating a new life cycle by either colonizing other surfaces and establishing new foci of infection or entering the bloodstream, leading to systemic infections [2,6]. Biofilms commonly exhibit resistance to chemical and physical assaults and demonstrate high resistance to several antifungal agents [3,6–8]. Consequently, alternative or adjunctive therapeutic techniques that are effective against biofilms need to be explored. In this context, antimicrobial photodynamic therapy (PDT) emerges as a promising strategy.

Antimicrobial photodynamic therapy is a promising therapeutic approach for biofilm treatment, utilizing photosensitive molecules known as photosensitizers (PSs) that can be activated by light of suitable wavelength and intensity [9]. Activation of PSs generates reactive oxygen species that cause cellular damage and induce cell death. Phenothiazinium dyes, including methylene blue (MB), are commonly employed as PSs in PDT. Other structurally similar molecules, such as azure A (AA), azure B (AB), and dimethyl methylene blue (DMMB), can also be used, although their actions have been less extensively studied. However, the efficacy of these dyes can be hindered by their tendency to aggregate in certain media [10]. The addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) has been shown to reduce aggregation and enhance the effectiveness of PDT in planktonic cultures [11–14].

The response of *C. albicans* to PDT treatment varies depending on the growth phase [2,15]. Nevertheless, the impact of the association between PSs and SDS on PDT response in different growth phases remains incompletely understood. Thus, this study aims to evaluate the effect of PDT using phenothiazinium dyes delivered in water or in conjunction with SDS on distinct stages of biofilm growth. Gaining insights into the effect of PDT on different growth stages of *C. albicans* can provide valuable knowledge for the development of effective therapeutic techniques targeting biofilms.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Methylene blue (MB), Azure A (AA), Azure B (AB) and 1,9-dimethyl Methylene Blue (DMMB), sodium dodecyl sulfate (SDS), were acquired from Sigma-Aldrich (Sant Louis, Missouri, USA).

Stock solutions of 1 mg/mL of each photosensitizer and 50 g/L of SDS were prepared with Milli-Q® sterile water. The stock solutions of PSs were stored in the dark at room temperature (25°C).

For suspension experiments each PS was prepared at a concentration of 100 mg/L at both mediums used. To achieve this, 1.0 mL of the stock solution of each PS was diluted in 10 mL of sterile Milli-Q water® (PSs water solutions) and also another 1.0 mL of the stock solution of each PS in 10 mL of SDS stock solution (PSs SDS solutions). All the PSs solutions were prepared at 100 mg/L, which was double the final concentration required, since the same volume of yeast inoculum was used in both water and PS solutions during the experiment. Subsequently, the final working concentration was halved (50 mg/L).

For biofilm experiments, 0.5 mL of each PS stock solution was diluted in 10 mL of sterile Milli-Q water®, and another 0.5 mL of the PS stock solution was diluted in 10 mL of SDS stock solution. These concentrations were selected based on a previous study conducted by the group [12,13].

2.2. Yeast suspension

Candida albicans ATCC 10231 yeast was grown in Sabouraud Dextrose Agar Medium (Kasvi, Curitiba, Brazil) at 37°C for 48 h. After preparing a suspension in water, the number of cells were counted using a Neubauer Chamber. Finally, the suspension was diluted to reach 5.0×10^7 cells/mL [13]. This suspension was used at the different experimental conditions analyzed at this study: Suspension assay, analyzing the PDT effect in yeast before adhesion to biofilm formation; mature biofilm, biofilm growth for 24 h and; biofilm in dispersion, which was biofilm growth for 48 h. Under these conditions, the experimental design consisted of 10 groups: CT (water control), CT SDS (sodium dodecyl sulfate control), PSs in water (AA, AB, MB, DMMB), and PSs associated with 0.25% SDS.

2.3. PDT before biofilm adhesion (suspension assays)

In 48-well microplates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), 0.20 mL of *C. albicans* suspension (5.0×10^7 cells/mL) and 0.20 mL of the treatment solutions (100 mg/L of each PS – AA, AB, MB, DMMB conveyed in water or 0.5% SDS) were gently mixed and kept in the dark during the pre-irradiation time (PIT = 5 min). Then, one plate was kept in the dark and the other was irradiated with an LED device (Biolambda, São Paulo, Brazil) following the light parameters presented in Table 1. The photosensitizers solutions were present during irradiation. This cluster device is comprised by 100 LEDs in a homogenizing chamber, presenting above 90% of beam homogeneity.

After irradiation, each sample was collected and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The supernatant containing the PS solution was discarded, the yeasts were washed with phosphate buffer saline (PBS), and the samples were resuspended in 1 mL of PBS. A volume of 0.10 mL of these suspensions were added to the wells, along with 0.30 mL of Sabouraud Dextrose Broth Medium (Kasvi, Curitiba, Brazil). Plates were incubated at 37°C, 50 rpm, for biofilm formation. After 24 h, samples were processed and the number of colony forming units per mL (CFU/mL) were counted.

For this, after removing the culture medium and washing with PBS, 0.20 mL of PBS was added to the wells and the biofilms were disrupted by multiple pipetting, collected in conical tubes, followed by shaking in a vortex (Jand Química, São Paulo, Brazil) for 1 min. An aliquot of 20 µL of these suspensions was taken from each sample, serial dilutions were performed in 180 µL of water (10^{-1} to 10^{-5}) and an aliquot of 20 µL of each diluted sample was seeded in lines on top of Petri dishes containing Sabouraud Agar Dextrose [13,16]. The Petri dishes were kept for 24 h at 37°C and the colony-forming units per mL (CFU/mL) were counted at the end of the incubation time. All experiments were performed in triplicate, in three independent experiments (n=9).

2.4. Biofilm formation

48-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were treated with fetal bovine serum (Vitrocell, São Paulo, Brazil) for 24 h. After that, it was removed and 0.10 mL of yeast suspension (5.0×10^7 cells/mL) was added to the wells, along with 0.30 mL of Sabouraud Dextrose Broth Medium (Kasvi, Curitiba, Brazil). Plates were incubated at 37°C, 50 rpm, for 24 h or 48 h for biofilm formation, being the maturation and dispersion phases, respectively. The supernatant was discarded and the adhered biofilms were washed with PBS. The biofilms were treated by the conventional method or double application, as described below.

2.4.1. PDT conventional treatment

The biofilms were exposed to PS solutions (MB, AA, AB and DMMB

Table 1
Light parameters used in PDT.

Parameter	Value
Wavelength (nm)	660
Spectral Width (nm)	20
Operation Mode	Continuous
Radiant Average Power (W)	6.08
Irradiated Area (cm^2)	163
Irradiance (mW/cm^2)	37.3
Exposure Time (min)	27
Radiant Exposure (J/cm^2)	60.4
Radiant Energy (kJ)	9.84

50 mg/L in water or with 0.25% SDS) and kept for 5 min in the dark at room temperature (25°C). Then, the irradiation was performed according to the light parameters shown in Table 1. The photosensitizers solutions were present during irradiation. At the end of the irradiation, the photosensitizing solutions were removed and the biofilms were washed with PBS and broken by multiple pipetting to perform the CFU count assay, as described above.

2.4.2. *PDT double application*

The biofilms were exposed to PS solutions (MB, AA, AB and DMMB 50 mg/L in water or with 0.25% SDS) and kept in the dark at room temperature (25°C) for 5 min. Immediately afterward, irradiation was performed according to the light parameters shown in Table 1. The photosensitizers solutions were present during irradiation. At the end of this process, the PSs were removed, the biofilms were washed with PBS, and sequentially new fresh PSs solutions were added to the wells, kept in the dark for 5 min again, and a new cycle of irradiation was performed under the same parameters. PSs solutions were removed after treatment; biofilms were washed with PBS and broken up by multiple pipetting in PBS, in order to perform the CFU counting assay, as previously described.

2.5. *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed by using Prism version 6.0 software. The log CFU/mL data were expressed as mean ± standard deviation, and the two-way ANOVA test, followed by the Bonferroni *post-test*, were applied to compare the values of the different antimicrobial treatments.

3. Results

In the adherence phase, PDT with PSs in water was not effective in causing *C. albicans* death (Fig. 1a). However, the delivery of PSs in 0.25% SDS was sufficient to completely inactivate the yeast with all phenothiazinium dyes. This effect was not solely due to the presence of 0.25% SDS, since the control SDS group also showed a reduction of approximately 1 log CFU/mL compared to the control in water. Moreover, all PSs studied did not exhibited considerable toxicity in the dark, as there was no reduction in CFU when administered in water and only a reduction of 1 log CFU/mL in SDS, similar to the one found in control SDS (Fig. 2). It is worth noting that SDS is widely used in hygiene and household products and has known safety, toxicity, and irritability properties [17,18].

When evaluating biofilms in the maturation phase (Fig. 1b), PDT with PSs delivered in water did not result in cell death. However, when the PSs were delivered in SDS, a reduction of approximately 0.5 log CFU/mL was observed compared to the PSs delivered in water. Nevertheless, no significant differences were found when comparing the SDS-treated group to the control SDS group.

In the dispersion phase (Fig. 1c), all the PSs demonstrated a reduction of approximately 0.38-0.92 log CFU/mL compared to the control in water, with MB being the most effective. Additionally, when comparing the effect of PSs delivered in water with the effect in SDS, all the PSs exhibited an increased antimicrobial effect. The reduction in log CFU/mL was approximately 0.49, 0.73, 0.78, and 1.03 for MB, AA, AB, and DMMB, respectively.

Considering that the antimicrobial effects, especially in biofilms, were not significant enough to support the suggestion to test this protocol in clinical trials, the authors opted to apply double treatment to the biofilms. When evaluating biofilms in the maturation phase (Fig. 3a), the delivery of PSs in water did not cause cell death, even with two PDT applications. Statistically, AA caused a reduction of around 0.2 log UFC/mL compared to the control. When delivering the PSs in SDS the antimicrobial effect of two irradiations reach around 0.8 log CFU/mL reduction in comparison to the PSs delivered in water. However, only

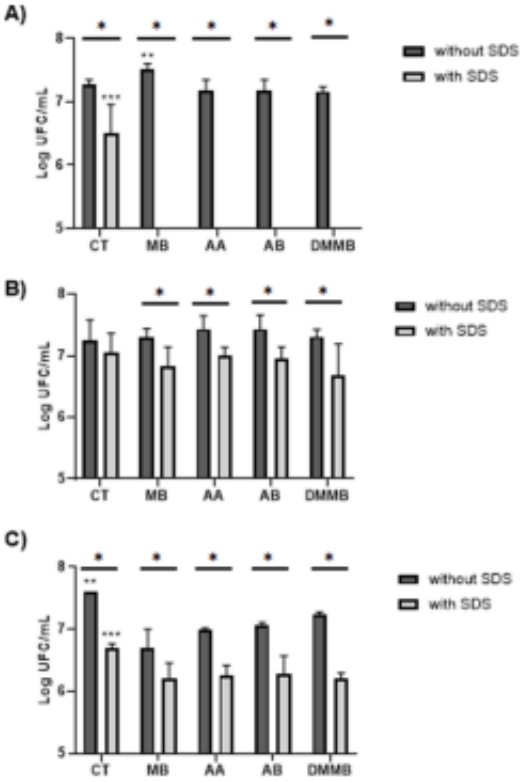


Fig. 1. PDT with MB, AA, AB and DMMB phenothiazine dyes at different stages of biofilm growth (a) adherence, when the yeast interacts with the surface and it is the first stage of biofilm grow; (b) maturation, when the matrix is already structured, with 24 h of biofilm growth at 50 rpm and 37°C; (c) dispersion, when the yeast starts to leave the biofilm to start a new infection focus; being 48 h of biofilm growth at 50 rpm and 37°C; where CT is the control. There are no surviving cells in (a) when MB, AA, AB and DMMB were associated to SDS The samples were irradiated at 660 nm, 37.3 mW/cm^2, 60.4 J/cm^2 for 27 min. Data presented as mean and standard deviation, triplicate and 3 independent experiments (n=9). *p<0.05, **p<0.05 compared to other groups without SDS, **p<0.05 compared to other groups with SDS.

MB showed statistically significant reduction compared to control SDS.

Double application in the dispersion phase (Fig. 3b) administering PSs in water did not lead to cell death. However, complete inactivation was found for AA, MB, DMMB administered in SDS, while AB caused a reduction of 1.2 log CFU/mL compared to the control in water.

4. Discussion

In this study, the phenothiazinium dyes were used as PDT agents, delivered either in water or 0.25% SDS, during different stages of biofilm formation: adherence, maturation, and dispersion.

It has been previously established that SDS can control aggregation of the phenothiazinium dyes [10,12,13] and enhance the antimicrobial effect when these PSs are employed for PDT in planktonic cultures [11–13]. Considering the mechanism of action of PDT in *C. albicans*, which involves the perforation of the cell wall and membrane by singlet oxygen, followed by the oxidative damage to internal structures [19], it was hypothesized that the reducing the aggregation of phenothiazinium

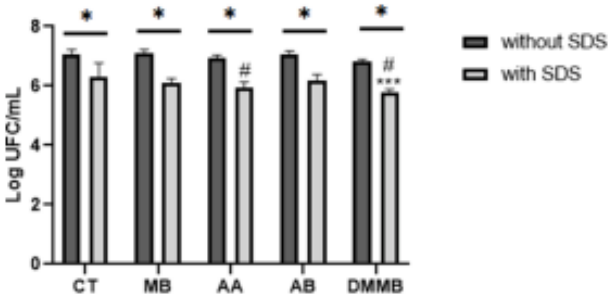


Fig. 2. Dark toxicity of the phenothiazinium dyes MB, AA, AB and DMMB applied before yeast adhesion; where CT is the control. Data presented as average and standard deviation, triplicate and 3 independent experiments (n=9). *p<0.05, #p<0.05 in relation to CT SDS, ***p<0.05 in relation to other SDS treatments.

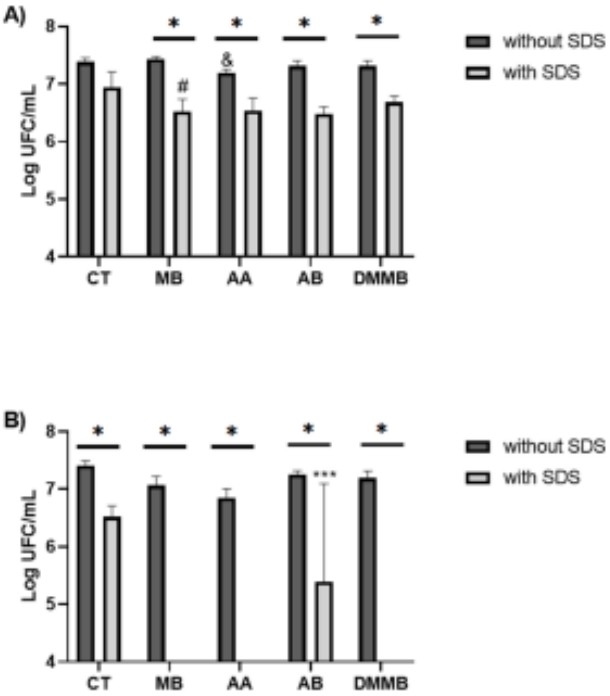


Fig. 3. Double application of PDT with phenothiazinium dyes MB, AA, AB and DMMB in the different biofilm growth stages (a) maturation, when the matrix is already structured, with 24 h of biofilm growth at 50 rpm and 37°C; (b) dispersion, when the yeast starts to leave biofilm to start new infection focus; being 48 h of biofilm growth at 50 rpm and 37°C; where CT is the control. There are no surviving cells in (b) when MB, AA and DMMB were associated to SDS. The samples were irradiated at 660 nm, 37.3 mW/cm^2, 60.4 J/cm^2 for 27 min. Data presented as average and standard deviation, triplicate and 3 independent experiments (n=9). *p<0.05, **p<0.05 compared to other SDS groups, #p<0.05 compared to CT SDS and &p<0.05 compared to CT without SDS.

dyes would increase singlet oxygen production [13,20], thereby increasing the antimicrobial effect of therapy. However, the inactivation of the microorganism organized in biofilms is a more intricate process. It is worth noting that a 3-Log reduction in colony forming units is the minimum threshold for considering microbial inactivation, and this criterion was used as the benchmark for treatment effectiveness [21].

The data obtained in this study demonstrated that delivering phenothiazinium dyes in water was not effective in inactivating *C. albicans* under the PDT conditions (concentration and light parameters) used in the study. Conversely, delivery in SDS significantly improved the antimicrobial effects. Similar finds of enhanced antimicrobial photodynamic effect in low aggregation media, such as low ionic force medium or when PSs were combined with urea, have been reported previously [22,23]. Other studies have also investigated the use of phenothiazinium dyes as a PS agents for PDT, delivered in media such as PBS, water or saline solution, and observed either no inactivation or the requirement for higher radiant exposure to achieve effective treatment [12,24–26].

For instance, Sabino et al. [26] employed MB in PBS to inactivate *C. albicans*, and found that the strain exhibited resistance to PDT, requiring higher radiant exposure to induce cell death. In the case of saline solution or PBS [23,24], it was known that medium with a high ionic strength promotes the formation of dimers, and reduce the effectiveness of PDT. In contrast, SDS is a surfactant, which may induce some permeabilization of the cell membrane, thereby enhancing the antimicrobial effect and reducing aggregation. It is well stablished that surfactants can extract proteins from cell membrane [27] and certain antimicrobial agents may act by disrupting or permeabilizing cell membrane [28]. This effect may explain the 1 Log reduction when control SDS is

delivered and how it contributes to the total antimicrobial effect when associated with photosensitizers.

The generation of reactive oxygen species, particularly singlet oxygen is robust during irradiation and serves as the primary trigger for the toxicity of PDT. Singlet oxygen has a short lifetime in aqueous media (around 2-4 ns) [29], which means that only the molecules in close proximity to the photosensitizer can cause damage to microorganisms or host cells. Therefore, the irradiation in the presence of methylene blue solution may not pose a significant concern regarding damage to host tissues.

Several studies have started to establish connections between the growth phase of the microorganism and antimicrobial action of PDT [2, 15,30]. In this study, the delivery of PSs in SDS enhanced the antimicrobial effects, depending on the specific growth phase examined.

When evaluating the effect of PDT with PSs in SDS on *C. albicans* biofilms during adhesion phase, inactivation of the strain was observed. Leonel et al. [30] using a MB concentration of 20 mg/L (approximately half of that used in this work) and radiant exposure of 30 J/cm^2 (also half of that used in this study) but with an irradiance 7 times greater, reported a reduction less than 1 log in the ability to form biofilms (which is equivalent to a 90% decrease in biofilm formation). Similarly, a 90% inhibition was achieved when 60 J/cm^2 (the same radiant exposure used here) was administered at a 5 μM (1.6 mg/L) MB PBS solution (31 times higher than used here) at 85.7 mW/cm^2 (around 2 times higher irradiance than used here) [31]. These data exemplify de divergent PDT parameters reported in the literature and highlight the challenge associated to achieving inactivation in planktonic culture.

When evaluating biofilms in the maturation and dispersion phases, it was observed that even the use of PSs in SDS was insufficient to disrupt the biofilm or reduce the number of viable cells. Freire et al. [32] combined MB (100 μM – 32 mg/L) with potassium iodide (100 mM) to enhance the effect of PDT on mature biofilms of *C. albicans in vitro*. The greatest logarithmic reduction in the CFU/mL in biofilm was 2.31 log, obtained in parameters of 31.8 mW/cm^2; 12.7 J/cm^2. Despite the use of an enhancer, PDT failed to achieve inactivation of mature biofilms. Other studies that evaluated the effects of PDT at various stages of biofilm formation have also reported significant challenges in causing biofilm inactivation, further supporting the findings of this study [2,30].

Sharma et al. [33] suggest that the chemical composition of the extracellular matrix of biofilms prevents antifungals from penetrating cells, allowing cells to grow and propagate within a biofilm without interference [33,34]. Drawing an analogy with these findings, PSs may also encounter difficulties in penetrating the biofilm, thereby reducing the effectiveness of PDT. Resistance has been associated with increased metabolic activity during biofilm development; however, it remains unclear whether resistance is the result of extracellular matrix production and / or biochemical changes, as well as changes in gene expression related to resistance [34] and up-regulation of efflux pumps [6].

Additionally, it is worth noting that biofilms possess a higher lipid content compared to yeast cells [35], which can impact the efficacy of PDT. Considering the oxidative action of PDT on different growth phases of *C. albicans*, proteins and nucleic acids are the main targets during the lag phase, while polysaccharides and lipids are more susceptible during the stationary phase [15]. Therefore, the reactive oxygen species generated by PDT, particularly singlet oxygen that acts on unsaturated bonds, may have a limited effect on stationary phase biofilms with lower levels of unsaturated lipids [35].

Furthermore, it is possible that adjusting the light parameters could enhance the antimicrobial effect in biofilms. We have recently demonstrated that in planktonic cultures of *C. albicans*, the antimicrobial effect of PDT is enhanced when MB is administered in conjunction with SDS, even with lower light parameters such as irradiance and radiant exposure [36]. Several studies have shown that repeated PDT sessions, even with lower light parameters, were more effective in terms of antimicrobial action [25,31,37]. Considering the lack of success in achieving biofilm inactivation with phenothiazinium dyes, even when delivered in SDS during the maturation and dispersion phases, it was decided to apply two sessions of PDT to the biofilm in this study.

In the biofilm maturation phase, even with two sessions of PDT, there was still no significant reduction or inactivation of the biofilm, similar to the results obtained with a single application. However, in the dispersion phase, the antimicrobial action was more evident when two sessions of PDT were administered. When PSs were delivered in water, the antimicrobial effect was minimal, whereas MB, AA, and DMMB delivered in SDS resulted in biofilm inactivation. Additionally, the use of AB in SDS showed a significant reduction compared to the control SDS group.

The authors proposed a hypothesis to explain the enhanced effect observed in the biofilm dispersion phase. It is suggested that the initial PDT application sensitized the biofilm, causing slight disruption of the extracellular matrix and inactivation of dispersed yeast cells. In the second PDT application, the PS was able to penetrate deeper into the matrix, leading to a more pronounced antimicrobial effect. Biofilms in the dispersion phase, which release yeast cells into the environment, [2, 4], may have a less structured and more susceptible matrix. This could facilitate the penetration and incorporation of the PS, allowing for biofilm inactivation. In contrast, biofilms in the maturation phase possess a stronger matrix, providing greater protection against chemical and physical interventions [4,6].

The extracellular matrix is mainly composed of proteins (55%), polysaccharides such as mannose and glucose residues (25%), extracellular lipids (15%), and nucleic acids (5%) [34]. Ergosterol has been considered essential for the formation of biofilms. The ergosterol levels increase as biofilm is produced and drops to almost half after biofilm maturation [38,39]. Given the chemical structure of ergosterol, which consists of carbon rings and double bonds, oxidative damage induced by PDT may be concentrated in these extracellular substances during the early growth phase and, to a greater extent, in dispersed cells during the dispersion phase.

Regarding the decision to administer two consecutive applications of PDT instead of increasing the irradiation time, several factors were taken into account. In clinical applications, such as in the oral cavity, the photosensitizer gets diluted by saliva over time, potentially reducing the PDT effect. Therefore, changing the PS solution between consecutive applications could enhance the antimicrobial action. Furthermore, increasing the irradiance may lead to photobleaching, which can diminish the overall antimicrobial efficacy. Once again, using a fresh PS solution for the second application could help maximize the PDT effect in the event of photobleaching.

In terms of the antimicrobial effects of the different photosensitizers (PSs), no significant differences were observed when they were evaluated in association with SDS prior to biofilm adherence, considering the parameters used (concentration, radiant exposure, and irradiance). However, it should be noted that differences might be observed when using sublethal doses of the PSs.

When assessing the effect of PDT on the biofilm in the dispersion phase, with the PSs delivered in combination with SDS and subjected to two irradiations, a weaker antimicrobial effect was observed for AB compared to the other PSs. These findings contradict previous data from our group, which demonstrated, in planktonic culture, that AA had a lower antimicrobial effect than AB, MB, and significantly lower than DMMB [12].]. It is possible that the concentration difference between the studies could account for this discrepancy, as the previous study used concentrations of 20 mg/mL, whereas in the current study, the final concentration of PSs was 50 mg/mL. It is plausible that at this higher concentration, in association with SDS, AB exhibits greater aggregation than AA, thereby reducing its antimicrobial effectiveness.

Clinically, the use of multiple sessions per week has shown promise in various applications of PDT. For instance, studies have reported a 45% reduction in oral candidiasis [40] and 89.13% reduction in acne vulgaris [41] with three sessions per week. A recent pilot clinical trial by Du et al. in 2021 [20] demonstrated that two sessions of PDT with MB in

HIV-positive patients with oral candidiasis led to a significant reduction in the number of CFU/mL and improvement in oral lesions, which was not observed after the first session of PDT. Other studies [40,42,43] suggest weekly applications of PDT, but none of them propose more than one application in the same session. The findings of this study suggest potential advantages in using at least two applications, but further investigations are required to refine the protocol, determine the minimum necessary parameters, and establish the optimal number of repeated applications.

The PIT of 5 min was chosen based upon the previous work of the group with planktonic *C. albicans* and the association of MB to SDS. However, considering the more complex structure of biofilms, an extended PIT could be considered even when using double application. Torres-Hurtado considered 30 min as the most effective PIT for MB PDT in *C. albicans* when performing multiple applications [31].

5. Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that PDT can effectively inhibit the formation of *C. albicans* biofilms when administered in a single session before biofilm installation, particularly when phenothiazinium dyes are associated with SDS. However, even with SDS delivery, the PSs were unable to completely break or reduce mature or dispersion biofilms, which respond similarly to one application of PDT. Interestingly, when two applications of PDT were employed, biofilms in the dispersion phase were successfully inactivated when using phenothiazinium dyes in combination with SDS. It is worth noting that the effectiveness of different phenothiazinium dyes associated with SDS before biofilm formation was similar, while in the biofilm dispersion phase, AB exhibited relatively lower effectiveness compared to other dyes. The study also highlights the importance of optimizing PDT parameters, such as light parameters and the number of sessions, to improve the antimicrobial efficacy against biofilms. However, further research is needed to establish the optimal protocol for PDT in biofilm eradication.

CRediT authorship contribution statement

Gabriela Benedito Machado: Writing – original draft, Resources, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Carolina Montovam Monteiro:** Writing – original draft, Visualization, Resources, Investigation, Funding acquisition. **José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves:** Visualization, Resources, Investigation, Funding acquisition. **Christiane Pavani:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support of this research (Grant Numbers 2016/03037–0); CP thanks CNPq for the Research Fellowship (304829/2020–0). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; CMM and GBM thank CAPES for the fellowships.

References

[1] M. Gulati, C.J. Nobile, Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms, Microbes Infect. 18 (2016) 310–321, https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002.

[2] P. Bapat, G. Singh, C.J. Nobile, Visible lights combined with photosensitizing compounds are effective against Candida albicans biofilms, Microorganisms 9 (2021) 1–20, https://doi.org/10.3390/microorganisms9030500.

[3] A.I.M. Vieira, J.I. dos Santos, Mechanisms of resistance of Candida albicans to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin, Rev. Bras. Anal. Clin. RBAC 49 (2017) 235–239.

[4] R. Pereira, R.O. dos Santos Fontenelle, E.H.S. de Brito, S.M. de Morais, Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance, J. Appl. Microbiol. 131 (2021) 11–22, https://doi.org/10.1111/jam.14949.

[5] P. Uppuluri, A.K. Chaturvedi, A. Srinivasan, M. Banerjee, A.K. Ramasubramaniam, J.R. Köhler, D. Kadosh, J.L. Lopez-Ribot, Dispersion as an important step in the Candida albicans biofilm developmental cycle, PLoS Pathog. 6 (2010), e1000828, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828.

[6] C.J. Nobile, A.D. Johnson, Candida albicans biofilms and human disease, Annu. Rev. Microbiol. 69 (2015) 71–92, https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330.

[7] G. Vediyappan, T. Rossignol, C. D'Enfert, Interaction of Candida albicans biofilms with antifungals : transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 2096–2111, https://doi.org/10.1128/AAC.01638-09.

[8] L.N. Dovigo, A.C. Pavarina, A.P.D. Ribeiro, I.L. Brunetti, C.A. de S. Costa, D. P. Jacomassi, V.S. Bagnato, C. Kurachi, Investigation of the photodynamic effects of curcumin against Candida albicans, Photochem. Photobiol. 87 (2011) 895–903, https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x.

[9] I.O.L. Bacellar, T.M. Tsubone, C. Pavani, M.S. Baptista, Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death, Int. J. Mol. Sci. 16 (2015) 20523–20559, https://doi.org/10.3390/ijms160920523.

[10] H.C. Junqueira, D. Severino, L.G. Dias, M.S. Gugliotti, M.S. Baptista, Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 2320–2328, https://doi.org/10.1039/b109753a.

[11] G.A. da Collina, F.V. Cabral, C.M. Monteiro, G.B. Machado, J.M.L.A. Gonçalves, F. Freire, R.A. Prates, M.S. Ribeiro, C. Pavani, The importance of combining methods to assess Candida albicans biofilms following photodynamic inactivation, Photodiagn. Photodyn. Ther. 38 (2022) 1–6, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102769.

[12] G.A. Collina, F. Freire, V. da Silva Barbosa, C. Berto Correa, H. Reis Nascimento, A. C.A.C. Ratto Tempestini Horliana, D.D.F. Teixeira da Silva, R. Araujo Prates, C. Pavani, Photodynamic antimicrobial chemotherapy action of phenothiazinium dyes in planktonic Candida albicans is increased in sodium dodecyl sulfate, Photodiagn. Photodyn. Ther. 29 (2020), 101612, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101612.

[13] G.A. da Collina, F. Freire, T.P. da C. Santos, N.G. Sobrinho, S. Aquino, R.A. Prates, D. de F.T. da Silva, A.C.R. Tempestini Horliana, C. Pavani, Controlling methylene blue aggregation: a more efficient alternative to treat Candida albicans infections using photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. Sci. 17 (2018) 1355–1364, https://doi.org/10.2174/1567201815666180904102257.

[14] J.P.J. Lyon, R.R.R. Resende, M.P.M. Rabelo, C. de Lima, L.M.L. Moreira, C.J. de Lima, L.M.L. Moreira, Synergic effect of photodynamic therapy with methylene blue and surfactants in the inhibition of Candida albicans, Mycopathologia 175 (2013) 159–164, https://doi.org/10.1007/s11046-012-9601-4.

[15] A. Baptista, C.P. Sabino, S.C. Núñez, A.A. Martin, M.S. Ribeiro, Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of Candida albicans, J. Photochem. Photobiol. B Biol. (2017) 76–84, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.013.

[16] B.D. Jett, K.L. Hatter, M.M. Huycke, M.S. Gilmore, Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria, Biotechniques 23 (1997) 648–650.

[17] D. Leskur, J. Bukić, A. Petrić, L. Zekan, D. Rusić, A. Šeiselja Perišin, I. Petrić, M. Stipić, N. Puizina-Ivić, D. Modun, Anatomical site differences of sodium lauryl sulfate-induced irritation: randomized controlled trial, Br. J. Dermatol. 181 (2019) 175–183, https://doi.org/10.1111/bjd.17833.

[18] J.W. Fluhr, A. Boenkessel, A. Akengin, S. Fuchs, J. Norgauer, P. Kleesz, R. Grieshaber, P. Elsner, Sequential application of cold and sodium lauryl sulphate decreases irritation and barrier disruption in vivo in humans, Br. J. Dermatol. 152 (2005) 702–708, https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06309.x.

[19] E. Ogasawara, Candida albicans sterilization using a light-emitting diode and methylene blue, Laser Ther. 27 (2018) 257–263.

[20] M. Du, W. Xuan, X. Zhen, L. He, L. Lan, S. Yang, N. Wu, J. Qin, R. Zhao, J. Qin, J. Lan, H. Lu, C. Liang, Y. Li, M.R Hamblin, L. Huang, Antimicrobial photodynamic therapy for oral Candida infection in adult AIDS patients: a pilot clinical trial, Photodiagn. Photodyn. Ther. 34 (2021), 102310, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102310.

[21] T. Maisch, T. Shimizu, G. Isbary, J. Heinlin, S. Karrer, T.G. Klämpfl, Y.F. Li, G. Morfill, J.L. Zimmermann, Contact-free inactivation of Candida albicans biofilms by cold atmospheric air plasma, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 4242–4247, https://doi.org/10.1128/AEM.07235-11.

[22] S.C. Nuñez, T.M. Yoshimura, M.S. Ribeiro, H.C. Junqueira, C. Maciel, M. D. Coutinho-Neto, M.S. Baptista, Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 150 (2015) 31–37, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.018.

[23] S.C. Núñez, A.S. Garcez, I.T. Kato, T.M. Yoshimura, L. Gomes, M.S. Baptista, M. S. Ribeiro, Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue, Photochem. Photobiol. Sci. 13 (2014) 595–602, https://doi.org/10.1039/c3pp50325a.

[24] A.A.C. Fumes, P.P.C. Romualdo, R.R.M. Monteiro, E. Watanabe, S.A.M.S. Corona, M.C.M. Borsatto, Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial

photodynamic therapy with diode laser, Lasers Med. Sci. 33 (2018) 67–73, https://doi.org/10.1007/s10103-017-2336-1.
[25] U. Melendez-Celis, T. Spezzia-Mazzocco, S. Persheyev, C. Lion, I. Samuel, J. C. Ramirez-San-Juan, R. Ramos-Garcia, Organic light emitting diode for in vitro antimicrobial photodynamic therapy of Candida strains, Photodiagn. Photodyn. Ther. 36 (2021) 1–7, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102567.
[26] C.P. Sabino, M. Wainwright, M.S. Ribeiro, F.P. Sellera, C. dos Anjos, M. da S. Baptista, N. Lincopan, Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy, J. Photochem. Photobiol. 208 (2020) 1–9, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111893.
[27] R. Rampado, F. Giordano, L. Moracci, S. Crotti, P. Caliceti, M. Agostini, F. Tavoballi, Optimization of a detergent-based protocol for membrane proteins purification from mammalian cells, J. Pharm. Biomed. Anal. 219 (2022), 114926, https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114926.
[28] W. Hong, L. Liu, Z. Zhang, Y. Zhao, D. Zhang, M. Liu, Insights into the antibacterial mechanism of PEGylated nano-bacitracin A against Streptococcus pneumonia: both penicillin-sensitive and penicillin-resistant strains, Int. J. Nanomed. 13 (2018) 6297–6309, https://doi.org/10.2147/IJN.S178596.
[29] F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross, Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, J. Phys. Chem. Ref. Data 22 (1993) 113, https://doi.org/10.1063/1.555934.
[30] L. de C. Leonel, M.L. Carvalho, B.M. da Silva, S. Zamuner, C. Alberto-Silva, M. S. Costa, L. de Carvalho Leonel, M.L. Carvalho, B.M. da Silva, S. Zamuner, C. Alberto-Silva, M. Silva Costa, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by Candida albicans, Photodiagn. Photodyn. Ther. 26 (2019) 316–323, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.026.
[31] S.A. Torres-Hurtado, J. Ramírez-Ramírez, A.C. Larios-Morales, J.C. Ramírez-San-Juan, R. Ramos-García, A.P. Espinosa-Texis, T. Spezzia-Mazzocco, Efficient in vitro photodynamic inactivation using repetitive light energy density on Candida albicans and Trichophyton mentagrophytes, Photodiagn. Photodyn. Ther. 26 (2019) 203–209, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.015.
[32] F. Freire, C. Ferraresi, A.O. Jorge, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy of oral Candida infection in a mouse model, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 14 (2016) 111–114, https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049.
[33] J. Sharma, S. Rosiana, I. Razzaq, R.S. Shapiro, Linking cellular morphogenesis with antifungal treatment and susceptibility in candida pathogens, J. Fungi 5 (2019) 1–28, https://doi.org/10.3390/jof5010017.
[34] J. Chandra, D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M. A. Ghannoum, Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance, J. Bacteriol. 183 (2001) 5385–5394, https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001.
[35] A.A. Lattif, P.K. Mukherjee, J. Chandra, M.R. Roth, R. Welti, M. Rouabhia, M. A. Ghannoum, Lipidomics of Candida albicans biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation, Microbiology 157 (2011) 3232–3242, https://doi.org/10.1099/mic.0.051086-0.
[36] J.M.L.A. Gonçalves, C.M. Monteiro, G.B. Machado, C. Pavani, The combination of methylene blue and sodium dodecyl sulfate enhances the antimicrobial photodynamic therapy of Candida albicans at lower light parameters, Photodiagn. Photodyn. Ther. (2023), 103583.
[37] L.P.P. Nunes, P.J.L. Crugeira, F.J.P. Sampaio, S.C.P.S. de Oliveira, J.M. Azevedo, C. L.O. Santos, L.G.P. Soares, I.D.W. Samuel, S. Pershyev, P.F. de Amstalo, A.L. B. Pinheiro, Evaluation of dual application of photodynamic therapy-PDT in Candida albicans, Photodiagn. Photodyn. Ther. 42 (2023), 103327.
[38] P.K. Mukherjee, J. Chandra, D.M. Kuhn, M.A. Ghannoum, Mechanism of fluconazole resistance in Candida albicans biofilms : phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols mechanism of fluconazole resistance in Candida albicans biofilms : phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols, Infect. Immun. 71 (2003) 4333–4340, https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4333.
[39] A. Rella, A.M. Farnoud, M. Del Poeta, Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence, Prog. Lipid Res. (2016) 63–72, https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003.Plasma.
[40] E.G.D.O. Mima, A.C. Pavarina, M.M. Silva, D.G. Ribeirão, C.E. Vergani, C. Kurachi, V.S. Bagnato, Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol. 112 (2011) 602–608, https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.05.019.
[41] Y. Dong, G. Zhou, J. Chen, L. Shen, Z. Jianxin, Q. Xu, Y. Zhu, A new LED device used for photodynamic therapy in treatment of moderate to severe acne vulgaris, Photodiagn. Photodyn. Ther. 13 (2016) 188–195, https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.06.007.
[42] F.P. Sellera, R.G. Gargano, F.C. Pogliani, Photodynamic therapy: a review, revista de educação continuada em medicina veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. 12 (2014) 6–13.
[43] L. El-Khordagui, N. El-Sayed, S. Galal, H. El-Gowelli, H. Omar, M. Mohamed, Photosensitizer-eluting nanofibers for enhanced photodynamic therapy of wounds: a preclinical study in immunocompromized rats, Int. J. Pharm. 520 (2017) 139–148, https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.004.

ANEXO E – Artigo submetido à publicação

Carta enviada por e-mail em 23/04/2024.

Journal: Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology
Title: Development of a Methylene Blue formulation for Antimicrobial Photodynamic Therapy in dentistry
Corresponding Author: Dr Christiane Pavani
Co-Authors: Carolina Montovam Monteiro; Céline Frochot
Manuscript Number: **JPHOTOBIOL-D-24-00438**