



UNIDADE DE ENSINO SUPERIOR DE FEIRA DE SANTANA

BACHARELADO EM BIOMEDICINA

GEISA DE JESUS SANTOS OLIVEIRA LEAL

WEVERTON BATISTA SANTOS CARVALHO

AVANÇOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM
Candida spp.

Feira de Santana – BA

2022

GEISA DE JESUS SANTOS OLIVEIRA LEAL

WEVERTON BATISTA SANTOS CARVALHO

AVANÇOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM
Candida spp.

Artigo apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina como pré-requisito para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina na Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana.

Orientadora: MSc. Carolina Ferreira Amorim

Feira de Santana – BA

2022

GEISA DE JESUS SANTOS OLIVEIRA LEAL

WEVERTON BATISTA SANTOS CARVALHO

L433a Leal, Geisa de Jesus Santos Oliveira

Avanços da terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Candida spp.* / Geisa de Jesus Santos Oliveira Leal; Neyla Santos Oliveira; Weverton Batista Santos Carvalho. Edição do autor. – Feira de Santana, 2022.

12 f; il.

Orientadora: Prof.^a MSc. Carolina Ferreira Amorim

TCC (graduação) Bacharelado em Biomedicina Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana – UNEF - 2022.

Data da defesa: 09/08/2022

1. Terapia fotodinâmica antimicrobiana 2. Resistência antifúngica. 3. Candidíase. I. Oliveira, Neyla Santos II. Carvalho, Weverton Batista Santos III. Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana – UNEF. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica Elaborada por: Deivisson Lopes Pimentel Bibliotecário CRB 5/1562



GEISA DE JESUS SANTOS OLIVEIRA LEAL

WEVERTON BATISTA SANTOS CARVALHO

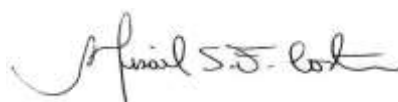
Aprovado em: 09/08/2022.

BANCA EXAMINADORA



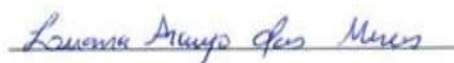
MSc. Carolina Ferreira Amorim

Mestre em Microbiologia
Universidade Federal da Bahia



Dr. Misael Silva Ferreira Costa

Doutor em Micologia Médica
Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana



Biomédica Luana Araújo das Mercês

AGRADECIMENTOS

Queremos agradecer primeiro a Deus por ter dado esta oportunidade de ter chegado até aqui e ter nos dado força e coragem para superar os desafios que vieram pela frente.

Somos gratos pelos nossos familiares que sempre esteve conosco, nos ajudando, incentivando e todo apoio incondicional.

Agradecemos ao professor Dr. José Luiz Carneiro da Rocha pelas aulas ministradas e por repartir seus conhecimentos, vivências, experiências conosco.

Por fim, agradecemos profundamente a nossa orientadora Esp. Carolina Ferreira Amorim por ter nos orientado e que sempre esteve disposta a ajudar e contribuir para um melhor aprendizado.

“Faça as coisas o mais simples que você
puder, porém não se restrinja às mais simples.”

- Albert Einstein

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Fluxograma da seleção dos artigos usados	11
---	----

LISTA QUADRO

Quadro 1: Resultados da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica em <i>Candida</i> spp.....	12
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
¹ O ₂	Oxigênio singleto
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
ATCC	American Type Culture Collection
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
cW	Centiwatt
FS	Fotossensibilizador
J/ cm ²	Joule por centímetro quadrado
MB	Azul de metileno
MGO	Oxalato verde malaquita
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mTHPP	5,10,15,20-Tetrakis(3-hidroxifenil)porfirina
mW	Megawatt
nm	Nanômetros
O ₂	Oxigênio
RB	Rosa de Bengala
ERO	Espécies reativas de oxigênio
TBO	Azul de toluidina
UFC	Unidade formadora de colônia
WGA	Aglutinina de germe de trigo Alexa Fluor® 488
µM	Microlitros

SUMÁRIO

Introdução	9
Metodologia	10
Resultados e Discussão	11
Conclusão	18
Referências	18
ANEXO.....	21

AVANÇOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM *Candida* spp.

Geisa de Jesus Santos Oliveira Leal, Neyla Santos Oliveira, Weverton Batista Santos Carvalho,
Carolina Ferreira Amorim.

Discente de Biomedicina, Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana (UNEF), Bahia, Brasil.

Discente de Biomedicina, Centro Universitário Nobre (UNIFAN), Bahia, Brasil.

*** Mestre em Microbiologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil.

*** Autor para correspondência e-mail: cfa.biomed@gmail.com

Resumo

A *Candida* spp. é um gênero fúngico que faz parte da microbiota humana, que reside como comensal, mas pode ser tornar patogênica, levando ao quadro clínico chamado candidíase, principal micose. Com o aumento das infecções fúngicas nas últimas décadas, em especial por *Candida* spp., vem avançando a resistência adquirida aos antifúngicos. Assim, novas formas terapêuticas vêm sendo exploradas como a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), que é um método atóxico e seletivo para patógenos, usando fotossensibilizador, luz e oxigênio para levar o estresse oxidativo a múltiplos alvos celulares. Assim, o presente estudo teve como objetivo demonstrar que aPDT é eficaz no tratamento em *Candida* spp. Para tanto, foi realizada uma revisão integrativa da literatura, onde foi utilizado a base dados PubMed, usando “TITLE- ABS” “photodynamic” AND “therapy” AND “*Candida*”. Após a triagem de 61 artigos, 7 foram incluídos nesta revisão, onde pode-se observar que a *C. albicans* é a espécie mais explorada em estudos para esse gênero, onde o sucesso dessa terapia foi demonstrado em culturas planctônicas e em biofilme, mas são necessários mais estudos que contemplem *Candida* não-*albicans*, para então avaliar a efetividade dessa técnica sobre a candidíase. Logo, é premente que os estudos se concentrem na elucidação dos mecanismos sobre as espécies clínicas desse gênero, a fim de melhorar a interação de fotossensibilizadores/fungo para que essa terapia possa futuramente servir como um tratamento complementar em candidíases superficiais por outras espécies do gênero.

Palavras-chaves: Terapia fotodinâmica antimicrobiana; Resistência antifúngica; Candidíase.

Abstract

Candida spp. is a fungal genus that is part of the human microbiota, which resides as a commensal, but can become pathogenic, leading to the clinical condition called candidiasis, the main mycosis. With the increase in fungal infections in recent decades, especially by *Candida* spp., acquired resistance to antifungals has been advancing. Thus, new therapeutic forms have been explored, such as Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), which is a non-toxic and selective method for pathogens, using photosensitizer, light and oxygen to take oxidative stress to multiple cellular targets. Thus, the present study aimed to demonstrate that aPDT is effective in the treatment of *Candida* spp. Therefore, an integrative literature review was carried out, using the PubMed database, using “TITLE- ABS” “photodynamic” AND “therapy” AND “*Candida*”. After screening 61 articles, 7 were included in this review, where it can be observed that *C. albicans* is the most explored species in studies for this genus, where the success of this therapy has been demonstrated in

planktonic cultures and in biofilm, but they are More studies are needed that include non-albicans *Candida*, to then evaluate the effectiveness of this technique on candidiasis. Therefore, it is urgent that studies focus on elucidating the mechanisms on the clinical species of this genus, in order to improve the photosensitizers/fungus interaction so that this therapy can in the future serve as a complementary treatment in superficial candidiasis by other species of the genus.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy; Antifungal resistance; Candidiasis.

Introdução

Nos últimos anos, as infecções fúngicas vêm impactando na saúde global com taxas de morbidade e mortalidade significativas (REVIE *et al.*, 2018). Estima-se que os fungos são responsáveis por 300 milhões de infecções com risco a vida anualmente (BEARDSLEY, J. *et al.*, 2018) e apesar da notoriedade desses patógenos, são negligenciados pelos órgãos de saúde sem um manejo no diagnóstico ou testes de sensibilidade à antifúngicos (PEYCLIT *et al.*, 2021). O gênero *Candida* é o principal fungo patogênico associado a infecções superficiais e invasivas (PAPPAS, *et al.*, 2018).

A *Candida* spp. faz parte de diferentes microbiotas do corpo, como a mucosa oral, gastrointestinal, vaginal e pele. Porém, pode ser patogênica levando ao quadro clínico conhecido como candidíase (SANTOS *et al.*, 2018). Nesse sentido, *Candida* spp. possuem mecanismos de patogenicidade que incluem: proteínas adesinas, enzimas hidrolíticas (SINGH; TÓTH; GÁCSE, 2020), defesa contra estresse oxidativo induzido pelo sistema imunológico (DANTAS *et al.*, 2015) e formação de biofilme que dificulta a ação de drogas e a defesa imunológica (NETT, 2016).

Entre as 150 espécies desse gênero, a *Candida albicans* se destacam como a espécie mais virulenta seguida pelas espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* (SEYOUM; BITEW; MIHRET, 2020) e *C. auris* (SARIS; MEIS; VOSS, 2018). Com o aumento das infecções fúngicas, especialmente do gênero *Candida*, a resistência

antifúngica adquirida vem emergindo, aumentando a dificuldade no tratamento, que dispõe de poucos agentes antifúngicos (PEYCLIT *et al.*, 2021) e as espécies de *Candida* estão apresentando perfis de multirresistência (DAHIYA *et al.*, 2022) e em outros fungos como *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp. (REVIE *et al.*, 2018). Logo, é premente o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de micoses.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) é uma técnica que vem se destacando para futuramente servir como uma terapia complementar em infecções superficiais. A técnica usada na aPDT se baseia nos princípios fotofísicos/fotoquímico usando uma substância fotossensibilizadora (FS) que ao ser excitada por uma luz com comprimento de onda adequada na presença de oxigênio gera dois mecanismos que levam danos localizados ao alvo (DELCANALE; ABBRUZZETTI; VIAPPIANI, 2022).

No primeiro mecanismo, ocorre a transfere elétrons do fotossensibilizador para o oxigênio molecular o que leva a formação de espécies reativas de oxigênio. No segundo mecanismo, ocorre a transferência de energia absorvida do fotossensibilizador para o oxigênio molecular formando o oxigênio singleto. Logo, a aPDT leva a um estresse oxidativo, que gera eventos oxidativo em múltiplas biomoléculas do patógenos, impossibilitando a aquisição deresistência. Para micoses superficiais, essa técnica pode proporcionar melhor condução clínica, uma vez que, os fungos por serem células eucariotas, o tratamento convencional com antifúngicos tende a ser prolongado o que leva a danos citotóxicos, especialmente no fígado (SHEN *et al.*, 2020).

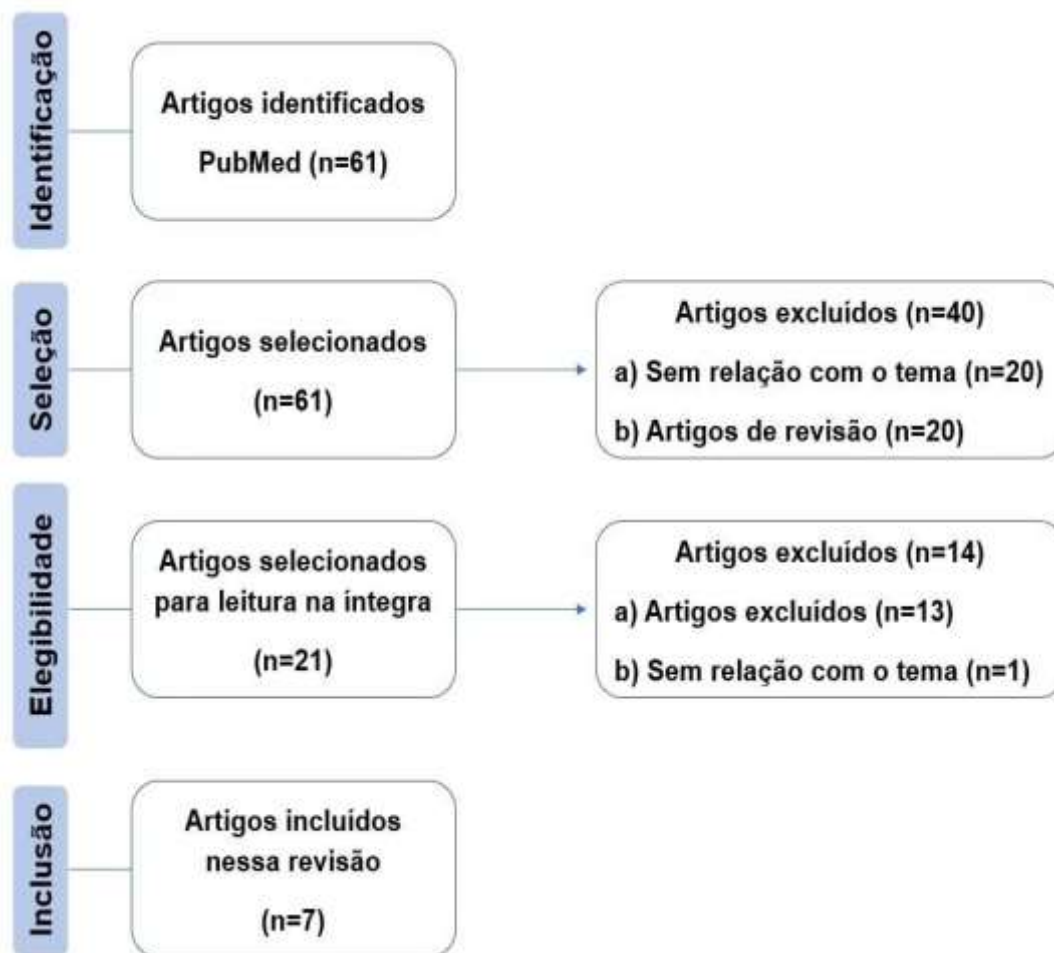
Tendo em vista o impacto das infecções fúngicas e sua limitação de tratamento com antifúngicos buscou-se na literatura alternativa de tratamento sem grandes efeitos adversos. Nessa premissa, levando em consideração a importância clínica da *Candida* spp. e o seu perfil de resistência, a presente revisão teve como objetivo demonstrar que a Terapia fotodinâmica Antimicrobiana é eficaz no tratamento de candidiases superficiais.

Metodologia

Nesta revisão integrativa, foram selecionadas as bases de dados eletrônicas PubMed. A busca foi realizada usando “TITLE-ABS” (photodynamic AND therapy

AND *Candida*), com os seguintes critérios de inclusão: (I) artigos publicados entre 2017 a 2022; (II) artigos completos de acesso livre escritos em inglês; (III) pesquisas que avaliaram experimentalmente *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* aPDT em *Candida* spp.; (IV) estudos com uso de substâncias fotossensibilizadoras. A **Figura 1** apresenta o fluxograma da identificação, seleção, elegibilidade e inclusão dos artigos usados nesta pesquisa.

Figura 1: Fluxograma da seleção dos artigos usados.



Fonte: Autoral, 2022.

Resultados e Discussão

Após a triagem dos artigos, foram incluídos 7 artigos que contemplaram os critérios mencionados na metodologia, onde os objetivos, principais metodologias e resultados desses estudos estão inseridos abaixo no **Quadro 1**.

Quadro 1: Resultados da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica em *Candida* spp.

Autores/Ano	Objetivo	Principais metodologias	Principais resultados
PUCELIK <i>et al.</i> , 2017	Avaliar uma série de derivados sintéticos de porfirina halogenada como fotossensibilizadores multifuncionais para aplicações biomédicas. Em <i>C. albicans</i> e em bactérias Gram positivas e negativas.	O ensaio de fotoinativação usou a <i>C. albicans</i> DIA286 incubada com a porfirina com menor afinidade polar (Cl ₂ PET) e outras duas porfirinas hidrofílicas (Cl ₂ POH; F ₂ POH) com concentrações entre 0,5 a 20 µM/Ml, com/sem adição de micelas poliméricas (Pluronic L121), que foi irradiada usando o LED de luz azul (420±20 nm). Controles de escuro (sem irradiação) foi realizado. Alíquotas foram semeadas e as unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificada.	Uma redução de 3-4 logs só foi alcançada para <i>C. albicans</i> com a porfirina F ₂ POH após 10 min de irradiação com 0,5 µM. Nenhuma redução foi observada no escuro.
HUANG <i>et al.</i> , 2018	Avaliar a combinação sinérgica da aPDT com antifúngicos convencionais em isolados clínicos de <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol.	Cultura planctônica de <i>Candida albicans</i> foi avaliada com Azul de toluidina (TBO; 0,4 mM/mL) com e sem associação dos antifúngicos (azólicos) fluconazol (0,25 µg/mL) e posaconazol (0,5 µg/mL), irradiados com 50 J/ cm ² 30 min. O biofilme consolidado também foi avaliado com TBO (2,5 mM/mL) com e sem associação do	Não foi observado redução de <i>C. albicans</i> na cultura planctônicas somente com os azólicos, apenas na aPDT com a associação dos antifúngicos e TBO foi capaz de reduzir totalmente a <i>C. albicans</i> (sem crescimento). Já no biofilme, a

		antifúngico (equinocandina) caspofungina (10 - 70 $\mu\text{g/mL}$), irradiados nas mesmas condições descritas acima. Controles de escuro foram realizados. Aliquotas foram semeadas e a UFC foi quantificada.	erradicação total foi obtida na concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$ de caspofungina com 2,5 mM/mL de TBO. Em ambos os testes, o controle sem irradiação não apresentou nenhum efeito citotóxico para <i>C. albicans</i> , indicando a ação fotodinâmica.
HSIEH <i>et al</i> , 2018	Desenvolver uma terapia que combinasse a ruptura do biofilme com os agentes antimicrobianos existentes. A terapia fotodinâmica (TFD) utilizando cúrcuma e luz azul foi testada como terapia independente e em combinação com o tratamento com fluconazol.	Foi utilizada a <i>Candida albicans</i> ATCC 90029 para avaliar a susceptibilidade de cultura planctônica com a cúrcuma (1- 80 μM), além disso, foi avaliado a combinação do fluconazol com este fotossensibilizador para identificar um possível efeito sinérgico em biofilme de <i>C. albicans</i> .	O resultado para cultura planctônica mostrou que a cúrcuma é eficiente, com redução de 6 logs com concentração de 5 μM , já em biofilme, a cúrcuma sozinha não foi eficiente, somente com a adição de fluconazol diminuiu para 5% da viabilidade celular, enquanto a cúrcuma e fluconazol alcançaram 55% e 20% respectivamente, indicando um efeito sinérgico com a combinação das drogas.

WIENCH <i>et al.</i> , 2021	Determinar o tempo ótimo de incubação necessário para a absorção do TBO por células de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i> , usando observação direta por microscopia óptica, e avaliar a eficácia da aPDT mediada por TBO em células planctônicas dessas cepas.	A avaliação microscópica consistiu na obtenção de uma série de imagens com aumento de 600x e contagem da % decélulas coradas. O efeito <i>in vitro</i> da aPDT mediada por TBO (50 μ M/mL) combinado com um laser de diodo (635nm, 400mW, 12 J/cm ² , CW) na viabilidade de células de levedura com diferentes tempos de incubação foi avaliado.	A presença de TBO no citoplasma foi observada em todas as espécies de <i>Candida</i> testadas e em todos os tempos de avaliação microscópica (30 s a 15 min). No entanto, as maiores porcentagens de células foram coradas em 7 e 10 min. A maior % redução de UFC/mL após aPDT mediada por TBO contra as espécies de <i>Candida</i> foi obtido para a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10.231, com 78,55%.
VOIT <i>et al.</i> , 2021	Identificar a localização do TMPyP em <i>C. albicans</i> antes e depois da irradiação usando a luz visível, para que houvesse a obtenção de informações da ação antifúngica e seus mecanismos de processo fotodinâmico utilizando PS.	<i>C. albicans</i> ATCC MYA-273 foi inoculada com a porfirina catiônica (TMPyP) com concentração de 1 μ M/mL, submetida a irradiação por 10 min com a luz de 20 mW/cm ² ; 12 J/cm ² (exceto controle escuro) para avaliação da ligação desta porfirina de carga positiva no processo da aPDT, utilizando a microscopia de fluorescência para identificação. Aliquotas foram semeadas e a UFC foi	Imediatamente após a incubação de <i>C. albicans</i> com TMPyP, a microscopia de fluorescência revelou um acúmulo de PS no envelope celular. Após irradiação com luz azul, a célula apresentou fluorescência vermelha em seu interior, o que indica que a aPDT está levando a um dano na parede

		quantificada. Além disso, foi realizado o ensaio de microdiluição em caldo para identificar a fototoxicidade com concentrações entre 0,5 - 50 $\mu\text{M/mL}$. Outro experimento foi realizado usando o conjugado de aglutinina de germe de trigo Alexa Fluor® 488 (WGA) para identificação de danos na parede celular.	celular com o seguinte influxo de PS no citosol. A incubação de <i>C. albicans</i> com WGA pode confirmar a paredecelular como sítio de ligação primária de TMPyP. No ensaio de fototoxicidade, a concentração de 5 μM e superior, atingiu uma redução na viabilidade de 5 log UFC (99,99%), <i>C. albicans</i> incubada com a TMPyP sem irradiação não apresentou redução de crescimento.
BAPAT <i>et al.</i> , 2021	Avaliar o efeito de diferentes de luzes (vermelhas, verdes e azuis) em combinação com compostos fotossensibilizantes comuns por suas eficácias em inibir e interromper biofilmes de <i>C. albicans</i> .	Cepas de <i>C. albicans</i> SN250, SC5314 e #0761 foram usadas no ensaio de biofilme com as luzes: vermelha (26 Watts 620–630 nm), verde (24 Watts 520–530 nm) e azul (24 -Watt 450 nm), Concentração de 400 $\mu\text{M/mL}$ foi usada para os fotossensibilizadores: rosa bengala (RB), azul de metileno (MB) e TBO. A inibição de aderência, inibição de desenvolvimento e depuração do	A luz vermelha com os FSs não demonstrou inibição de aderência nem de depuração, mas foi observado inibição de desenvolvimento (30% MB; 40% TBO; 45% MB). A luz verde com os FSs também não demonstrou inibição de aderência e depuração, porém foi evidenciado a inibição de

		biofilme foram avaliadas nesse ensaio, controle escuro foi usado.	desenvolvimento moderada (45% MB; 25% TBO; 30% RB). Em contrapartida, a luz azul com os FSs obteve inibição de aderência (80% MB e TBO; 70% RB), inibição de desenvolvimento (17% MB; 15% TBO; 10% RB) e depuração do biofilme maduro (75% MB; 70% TBO; 60% RB).
VALKOV <i>et al.</i> , 2021	Encontrar uma formulação eficaz para o tratamento da onicomicose. Para atingir esse objetivo, testamos o efeito de três tipos de FSs, RB, oxalato verde malaquita (MGO) e MB sobre <i>C. albicans</i> .	Células planctônicas de <i>C. albicans</i> foram inoculadas com os FSs, respectivamente, com concentrações correspondendo a 50 e 250 $\mu\text{M/mL}$ que foram irradiadas por 4h com luz branca de 18W com faixa de emissão de 400-700 nm (exceto controle do escuro). Alíquotas foram semeadas e a UFC foi quantificada.	MB não teve nenhum efeito na <i>Candida albicans</i> enquanto a RB obteve erradicação total (sem crescimento) em apenas 30 min nas concentrações de 50 e 250 μM , MGO só conseguiu erradicar com a concentração de 250 μM após as 4h de erradicação. Nenhuma diminuição foi observada no controle do escuro.

A aPDT, vem emergindo como um método alternativo devido ao cenário de resistências aos antimicrobianos, em especial, as resistências antifúngicas, onde as espécies de *Candida*, principal patógeno fúngico em humanos vem demonstrado perfis de resistência que dificultam no tratamento da candidíase (DAHIYA, S. et al. 2022). Para o sucesso da fotoinativação, são necessários alguns fatores, como por exemplo: (I) fotossensibilizador deve ter seletividade ao alvo microbiológico; (II) possuir baixa citotoxicidade no escuro; (III) FS tem que ter afinidade com membranas citoplasmáticas, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA); (IV) fotodano localizado (AMOS-TAUTUA; SONGCA; OLUWAFEMI, 2019). Nessa linha, para geração do processo oxidativo, o FS deve ser excitado com um comprimento de onda adequado que levará a sua ativação fotofísica/fotoquímica (DELCANALE; ABBRUZZETTI; VIAPPIANI, 2022).

Bapat e colaboradores (2021), testaram diferentes luzes (vermelhas, verdes e azuis) em combinação com diferentes fotossensibilizadores, como rosa bengala, azul de metileno e azul de toluidina, respectivamente para atividade antibiofilme de em *C. albicans*. Entre as luzes testadas no processo de fotoativação dos FSs, a luz azul com comprimento de onda de 450 nm foi o mais eficiente, obteve inibição de aderência (80% MB e TBO; 70% RB), inibição de desenvolvimento (17% MB; 15% TBO; 10% RB) e depuração do biofilme maduro (75% MB; 70% TBO; 60% RB). A luz vermelha e verde possui comprimento de onda de 620–630 nm e 520–530 nm, respectivamente. Ambos os comprimentos de luzes não foram tão eficientes para excitação dos fotossensibilizadores, que obtiveram apenas inibição do desenvolvimento do biofilme (luz vermelha – 30% MB; 40% TBO; 45% RB e luz verde – 45% MB; 25% TBO; 30% RB), mostrando a necessidade de se utilizar uma faixa de comprimento de onda adequada para então, ocorrer os eventos fotooxidativos.

Além desse fator, é de suma importância que o fotossensibilizador tenha afinidade com o microrganismo, isso porque, os eventos oxidativos precisam penetrar a parede celular do microrganismo, para então oxidar os componentes intracelulares e assim levar a fotoinativação do patógeno (CALZAVARA-PINTON *et al.*, 2012; ITO, 1978). Com isso, pesquisadores (WIENCH *et al.*, 2021) avaliaram a capacidade de ligação do azul de toluidina avaliado por microscopia

óptica em diferentes tempos de exposição do FS (30 s a 15 min) nas espécies *C. albicans* ATCC 90.028, *C. albicans* ATCC 10.231, *C. glabrata* ATCC 90.030, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 90.018.

Assim, foi identificado em *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* que o tempo necessário para absorção foi de 7 min, para as demais espécies, *C. albicans* ATCC 90018 e *C. krusei* precisaram de 10 min para absorção. Voit e colaboradores (2021), realizaram um experimento semelhante com *C. albicans*, usando a porfirina TMPyP, onde avaliaram a ligação do FS com microscopia de fluorescência. Com isso, foi identificado que antes do processo de fotoativação a porfirina se ligou rapidamente sobre a superfície da levedura, formando um anel ao redor da célula e somente após a fotoativação foi evidenciado o fotossensibilizador no interior da célula. Além disso, a WGA que se liga de forma específica ao N-acetil-D-glucosamina (percursor da quitina), evidenciou a afinidade do TMPyP com a parede celular de *C. albicans*.

Em ambos os estudos (WIENCH *et al.*, 2021; VOIT *et al.*, 2022) foram utilizados fotossensibilizadores que possuem cargas positivas. A carga do fotossensibilizador para inativação fúngica é importante pelo fato dos componentes celulares do fungo apresentarem carga negativa (CALZAVARA-PINTON *et al.*, 2012) e a diferenças entre a carga do FS com o patógeno gera uma atração eletrostática (GEORGE; HAMBLIN; KISHEN 2009), havendo então uma rápida interação como pode-se observar. Um fator que pode aumentar o potencial de inativação de fotossensibilizadores aniônicos sobre fungos é, por exemplo, a capacidade de gerar agentes fotooxidativos, especialmente o oxigênio singleto, que possui uma alta afinidade com lipídeos, proteínas e DNA (AERSSSENS *et al.*, 2022).

Conforme observado por Valkov e colaboradores (2021), que entre os fotossensibilizadores aniônicos, rosa de bengala, oxalato verde malaquita e azul de metileno sobre *C. albicans*, apenas o RB foi o mais eficaz, com erradicação total da levedura. O RB ao ser excitado produz 80% de oxigênio singleto e 20% de espécies de oxigênio (FREIRE *et al.*, 2014), assim, ao ser fotoativado, o oxigênio singleto compensa as diferenças entre as cargas do FS e o fungo, levando a destruição celular de *C. albicans*, onde este oxigênio energético possui um alto poder oxidativo para diversas biomoléculas (REF).

Seguindo essa mesma linha, a parede celular fúngica tem um importante papel para que ocorra o efeito fotooxidativo e posteriormente a destruição celular, conforme mencionado. A baixa permeabilidade e porosidade (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020) dificulta a difusão do fotossensibilizador, conforme observado por Pucelik e colaboradores (2017), onde a porfirina F₂POH levou a redução entre 3-4 logs de *Candida albicans*, o mesmo FS obteve 6 logs de redução com *Staphylococcus aureus* que possui uma parede celular menos complexa em comparação com a levedura.

Ademais, o efeito inibitório da aPDT pode ser ainda aumentado com adição de antifúngicos. O efeito sinérgico é caracterizado quando duas drogas associadas apresentam um efeito maior do que usadas separadamente (TALLARIDA, 2011). Assim, pesquisadores (Hsieh *et al.*, 2018) constataram que a combinação do fotossensibilizador cúrcuma com fluconazol sobre o biofilme de *C. albicans*. A combinação cúrcuma-fluconazol diminuiu para 5% da viabilidade celular do biofilme, enquanto a aPDT e o fluconazol diminuíram 55% e 20%, respectivamente.

Já Huang e colaboradores (2018), avaliaram o efeito sinérgico de cultura planctônica e biofilme com azul de toluidina-fluconazol e posaconazol, além a caspofungina, em cepa selvagem de *C. albicans* e isolados clínicos com resistência à fluconazol. Com isso, a combinação entre o TBO e fluconazol foi capaz de erradicar as culturas planctônicas mesmo havendo perfis de resistências entre os isolados, demonstrando dessa forma a eficiência da aPDT, efeito semelhante também foi obtido com o posaconazol. Porém, diferente do que se foi observado com Hsieh e colaboradores (2018), a combinação desses triazóis com TBO não apresentou efeito sinérgico na erradicação do biofilme, apenas com a combinação da equinocandina (caspofungina), foi obtido o efeito sinérgico, com a erradicação do biofilme.

Através desses estudos, pode-se observar que aPDT é eficaz em inativar a *Candida albicans*, a espécie mais virulenta do gênero, tanto em cultura planctônica, quanto associados ao biofilme, com diferentes fotossensibilizadores, onde efeitos maiores podem ser alcançados em combinação de antifúngicos convencionais. Contudo, a maioria dos estudos se limita apenas para essa espécie, sem explorar as espécies de *Candida* não-*albicans*, que também possuem grande importância clínica. Assim, é necessário mais estudo explorando outras espécies para elucidação dos

mecanismos de inativação, bem como, os tipos de fotossensibilizadores/luzes adequadas para o sucesso da aPDT frente a esses patógenos.

Conclusão

Em suma, como se pode observar, o sucesso para aPDT envolve múltiplos fatores, como por exemplo (I) comprimento de onda adequando para excitação do FS; (II) carga do FS; (III) geração de espécies oxidativas, especialmente oxigênio singlete; (IV) capacidade de atuar na parede celular. Esses fatores corroboram para eficiência da aPDT, dessa forma, é premente que os estudos foquem nesses aspectos, além de explorar outras espécies de *Candida* não-*albicans*, para que haja futuramente a aplicação dessa terapia no tratamento de candidíases superficiais por outras espécies, além de *C. albicans*.

Referências

- AERSSSENS, D. *et al.* A Photosensitized Singlet Oxygen ($^1\text{O}_2$) Toolbox for Bio-Organic Applications: Tailoring $^1\text{O}_2$ Generation for DNA and Protein Labelling, Targeting and Biosensing. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 778, 2022.
- AMOS-TAUTUA, B. M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2456, 2019.
- BAPAT, P.; SINGH, G.; NOBILE, C. J. Visible lights combined with photosensitizing compounds are effective against *Candida albicans* biofilms. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 500, 2021.
- BEARDSLEY, J. *et al.* Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1175-1191, 2018.
- CALZAVARA-PINTON, P. *et al.* Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 512-522, 2012.
- DAHIYA, S. *et al.* Antimycotic Drugs and their Mechanisms of Resistance to *Candida* species. **Current Drug Targets**, v. 23, n. 2, p. 116-125, 2022.

- DANTAS, A. S. *et al.* Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 142-165, 2015.
- DELCANALE, P.; ABBRUZZETTI, S.; VIAPPIANI, C. Photodynamic treatment of pathogens. **La Rivista del Nuovo Cimento**, v. 45, n. 6, p. 407-459, 2022.
- FREIRE, F. *et al.* Comparison of the effect of rose bengal-and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 949-955, 2014.
- GARCIA-RUBIO, R. *et al.* The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2993, 2020.
- GEORGE, S.; HAMBLIN, M. R.; KISHEN, A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 6, p. 788-795, 2009.
- HSIEH, Y. H. *et al.* An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 337, 2018.
- HUANG, M. C. *et al.* Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm cells of *Candida albicans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n.2, p. 434, 2018.
- ITO, T. Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: the 1O_2 hypothesis as a driving force in recent research. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 4-5, p. 493-506, 1978.
- NETT, J. E. The host's reply to *Candida* biofilm. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 33, 2016.
- PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.
- PEYCLIT, L. *et al.* Drug repurposing in medical mycology: Identification of compounds as potential antifungals to overcome the emergence of multidrug-resistant fungi. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, p. 488, 2021.

PUCELIK, B. et al. Properties of halogenated and sulfonated porphyrins relevant for the selection of photosensitizers in anticancer and antimicrobial therapies. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0185984, 2017.

REVIE, N. M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

SARIS, K.; MEIS, J. F.; VOSS, A. *Candida auris*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 334-340, 2018.

SEYOUM, E.; BITEW, A.; MIHRET, A. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species isolated in different clinical samples and their *in vitro* antifungal susceptibility profile in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

SHEN, J. Jemec.; G.; Arendrup, M. C.; Saunte, D. M. L. Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101774, 2020.

SINGH, D. K.; TÓTH, R.; GÁCSE, A. Mechanisms of pathogenic *Candida* species to evade the host complement attack. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 94, 2020.

TALLARIDA, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes & cancer**, v. 2, n. 11, p. 1003-1008, 2011.

VALKOV, A; ZINIGRAD, M.; NISNEVITCH, M. Photodynamic Eradication of *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 263, 2021.

VOIT, T. et al. Spatial distribution of a porphyrin-based photosensitizer reveals mechanism of photodynamic inactivation of *Candida albicans*. **Frontiers in Medicine**, p. 991, 2021.

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, 2021.

ANEXO

REVISTA BRASILEIRA MULTIDISCIPLINAR, Qualis B1

Diretrizes para autores

Os trabalhos a serem submetidos à ReBra M deverão, obrigatoriamente, ser enquadrados em uma das seguintes modalidades:

- a) **Artigos originais:** trabalhos inéditos de pesquisa científica com no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, quadros, esquemas, etc.;
- b) **Artigos de revisão:** estudo aprofundado sobre um tema específico, uma avaliação crítica e objetiva do estado da arte e a discussão necessária para o avanço do conhecimento sobre o tema. Deverão ter no máximo 35 páginas;
- c) **Artigos de divulgação:** sínteses de conhecimentos disponíveis sobre determinado tema, mediante análise e interpretação de bibliografia pertinente, com no máximo 25 páginas;
- d) **Comunicações breves:** resultados preliminares de pesquisa, com no máximo 15 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências;
- e) **Resenhas ou análise crítica de livros:** máximo 5 páginas;
- f) **Relatos de caso:** máximo 20 páginas

Caso os autores optem pelo idioma inglês ou espanhol, deverão enviar, na submissão do manuscrito, uma carta de revisão do idioma emitida por empresa ou profissional habilitado.

PREPARAÇÃO DOS MANUSCRITOS

As submissões dos manuscritos deverão atender aos seguintes critérios:

- a) O manuscrito deve ser redigido em português, inglês ou espanhol. Seja qual for o idioma escolhido, o resumo e as palavras-chave devem ser apresentados em português e em inglês.
- b) Os textos deverão ser enviados em arquivo Word (.doc ou .docx), página A4 (margens superior e inferior de 2,5 cm e margens direita e esquerda de 3,0 cm), utilizando fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento de 1,5 cm entre as linhas, sendo o texto justificado;
- c) A página de apresentação do manuscrito deverá conter inicialmente o título do manuscrito.
- d) Na segunda página do arquivo, deverão ser apresentados os resumos redigidos em português (deve aparecer primeiro) e em inglês, cada um deles em um único parágrafo (com no máximo 250 palavras com espaçamento simples entre linhas). O texto deve ser claro e conciso, contendo: breve introdução, objetivo(s), procedimentos metodológicos, resultados e conclusões.

Abaixo de cada um dos resumos devem ser apresentadas de 3 a 5 palavras-chave, também redigidas em português e em inglês. Elas devem ser redigidas em letras minúsculas e separadas por ponto.

Acima do abstract (resumo em inglês) deve ser apresentada a versão em inglês para o título do trabalho.

e) Na sequência, o trabalho deverá ser apresentado com os seguintes subtítulos:

- Introdução (o último parágrafo deve apresentar os objetivos do estudo)
- Metodologia (ou material e métodos)
- Resultados e discussão (NÃO pode ser dividido em dois subtítulos "Resultados" seguido de "Discussão")
- Conclusão
- Agradecimentos (Opcional)
- Referências

f) Quadros, figuras (incluindo gráficos e esquemas) e tabelas deverão utilizar o mesmo padrão de letra do texto (Times New Roman) e serem numerados sequencialmente (conforme aparecem no texto), em algarismos arábicos.

Todas as modalidades de artigos devem se enquadrar nestes moldes, com exceção das resenhas.