



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**CURSO DE FISIOTERAPIA**

**ARTUR MONTEIRO DA SILVA**

**ESTUDO DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM  
MEIO DE CULTURA DE CANDIDA ALBICANS**

**FORTALEZA**

**2022**

ARTUR MONTEIRO DA SILVA

ESTUDO DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM  
MEIO DE CULTURA DE CANDIDA ALBICANS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Fisioterapia pertencente à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito básico para a conclusão do bacharelado fisioterapia.

Orientador (a): Prof. Dr. José Carlos Tatmatsu Rocha

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

---

S578e Silva, Artur Monteiro da.  
Estudo de eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica em meio de cultura de candida albicans / Artur Monteiro da Silva. – 2022.  
28 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará,  
Faculdade de Medicina, Curso de Fisioterapia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. José Carlos Tatmatsu Rocha.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Candida albicans. 3. Testes de sensibilidade microbiana. I.  
Título.

CDD 615.82

ARTUR MONTEIRO DA SILVA

ESTUDO DE EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM  
MEIO DE CULTURA DE CANDIDA ALBICANS

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Fisioterapia pertencente à Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito básico para a  
conclusão do bacharelado fisioterapia.

Data da aprovação: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. José Carlos Tatmatsu Rocha (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Vilena Barros de Figueiredo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Matheus Vieira Nascimento  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## RESUMO

**Introdução:** *Candida albicans* é um fungo presente na flora de indivíduos saudáveis. Entretanto, tais organismos em algumas patologias podem causar infecções. A Terapia Fotodinâmica (PDT) utiliza uma fonte de luz e um agente fotossensibilizador (PS) que quando estimulado produz Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) citotóxico, acarretando em apoptose. A PDT apresenta ação antimicrobiana, inclusive em meio a microrganismos multirresistentes. **Objetivo:** Definir a concentração inibitória mínima (MIC) dos fotossensibilizantes azul de Metileno e azul de ortotoluidina irradiados por um diodo emissor de luz (LED) em uma cultura *in vitro* de *Candida albicans*. **Metodologia:** Foi realizada uma análise *in vitro* de diferentes durações de exposição à fonte de luz e concentrações seriadas de fotossensibilizadores (PS), azul de metileno e azul de toluidina, buscando evidenciar a inativação do fungo *C. Albicans*. O LED utilizado possui comprimento de onda de 630 nm, potência do cluster de 0,15w. O experimento foi subdividido em três fases relacionadas as dosagens da PDT: 1ª fase aplicou o LED por 30 segundos (11,84 J/cm<sup>2</sup>); 2ª fase o tempo de aplicação foi reduzido para 15 segundos (5,92 J/cm<sup>2</sup>); 3ª fase adotou a mesma dosagem do LED mas aumentando o número de subgrupos com intuito de confirmar a efetividade da PDT. **Resultados:** O PS azul de metileno não apresentou efeitos favoráveis durante a primeira fase, enquanto o azul de toluidina foi submetido às três fases. A MIC de azul de toluidina não foi encontrada na primeira fase, no entanto as duas últimas fases 0,7µM apresentaram resultados promissores. **Conclusão:** Esse estudo demonstrou a eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica utilizando azul de toluidina em meio de culturas de candida. A viabilidade da PDT poderá guiar futuros estudos envolvendo infecções por *Candida Albicans*, sendo um tratamento eficaz e sem efeitos adversos.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica; *Candida albicans*; Testes de sensibilidade microbiana.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Candida albicans* is a fungus present in the flora of healthy individuals. However, such organisms in some pathologies can cause infections. The Photodynamic Therapy (PDT) uses a light source and a photosensitizing agent (PS) that when stimulated produces cytotoxic Reactive Oxygen Species (ROS), leading to apoptosis. The PDT presents antimicrobial action, including among multidrug-resistant microorganisms. **Objective:** To define the minimum inhibitory concentration (MIC) of methylene blue and orthotoluidine blue photosensitizers irradiated by a light-emitting diode (LED) in an in vitro culture of *Candida albicans*. **Methodology:** An in vitro analysis of different durations of exposure to the light source and serial concentrations of photosensitizers (PS), methylene blue and toluidine blue, was performed in order to demonstrate the inactivation of the fungus *C. Albicans*. The LED used has a wavelength of 630 nm, cluster power of 0.15w. The experiment was subdivided into three phases related to the dosages of PDT: 1st phase applied the LED for 30 seconds ( $11.84 \text{ J/cm}^2$ ); 2nd phase the application time was reduced to 15 seconds ( $5.92 \text{ J/cm}^2$ ); 3rd phase adopted the same dosage of LED but increasing the number of subgroups in order to confirm the effectiveness of PDT. **Results:** Methylene blue PS showed no favorable effects during the first phase, while toluidine blue underwent all three phases. The MIC of toluidine blue was not found in the first phase, however the last two phases  $0.7\mu\text{M}$  showed promising results. **Conclusion:** This study demonstrated the antimicrobial efficacy of photodynamic therapy using toluidine blue in candida cultures. The feasibility of PDT may guide future studies involving *Candida Albicans* infections, being an effective treatment without adverse effects.

**Keywords:** Photodynamic therapy; *Candida albicans*; Microbial sensitivity testing.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CVV - Candidíase Vulvovaginal

DM - Diabetes Mellitus

LED - Diodo Emissor de Luz

MB - Azul de Metileno

MIC - Concentração Inibitória Mínima

PACT - Quimioterapia Antimicrobiana Fotodinâmica

PDT - Terapia Fotodinâmica

PS - Fotossensibilizador

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

TBO - Azul de Ortotoluidina

UFC - Universidade Federal do Ceará

UPD - Úlcera no Pé Diabético

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

YNB - Yeast Nitrogen Base

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Hipótese.....</b>	<b>11</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Normas de segurança.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Parâmetros da irradiação.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Preparação dos corantes.....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Ativação dos microrganismos.....</b>	<b>14</b>
<b>4.5 Fases experimentais.....</b>	<b>14</b>
<b>4.5.1 Fase 1.....</b>	<b>15</b>
<b>4.5.2 Fase 2.....</b>	<b>16</b>
<b>4.5.3 Fase 3.....</b>	<b>17</b>
<b>4.6 Avaliação de crescimento e análise de dados.....</b>	<b>17</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Fase 1.....</b>	<b>18</b>
<b>5.2 Fase 2.....</b>	<b>18</b>
<b>5.3 Fase 3.....</b>	<b>19</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>



## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* (*C. Albicans*) é um fungo dimórfico componente da microflora humana sendo comumente encontrado na pele, trato gastrointestinal e no sistema reprodutor humano, se portando como um comensal inofensivo que não causa doenças em pessoas saudáveis. Todavia, o estado imunológico do indivíduo pode levar a alterações patológicas e infecções superficiais e/ou sistêmicas (GONÇALVES et al., 2016; PASCOE; MAILLARD, 2021; WIENCH et al., 2019). Desde a década de 1990, estudos epidemiológicos passaram a investigar sua colonização digestiva, sendo considerado na época, a principal causa de mortalidade e uma das principais causadoras de septicemia em ambientes hospitalares (POULAIN, 2015). Na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), *Candida Albicans* é a causa mais recorrente de infecções em 79% dos casos (CLIFF et al., 2008).

Nas últimas duas décadas, esta levedura tornou-se um grande problema de saúde pública. A doença de base e intervenções hospitalares favoreceram o desenvolvimento patogênico multirresistente deste fungo em pacientes imunossuprimidos, portadores de algumas doenças endócrinas e até mesmo idosos, gerando altos custos em saúde em todo o mundo. Além disso, esse fungo conta com uma variedade de células hospedeiras, incluindo Th17, que favorecem a sua ação durante o processo infeccioso (DADAR et al., 2018). O espectro de doenças causadas por *Candida Albicans* pode abranger infecções vaginais, como candidíase vulvovaginal (CVV), que afetam 75% das mulheres ao menos uma vez na vida, a infecções profundas que podem levar à morte (DENNING et al., 2018; POULAIN, 2015).

A diabetes mellitus (DM) é a doença endócrina mais comum do mundo, envolvendo uma série de distúrbios metabólicos. Pode ser definida pela incompetência na produção ou absorção de insulina, resultando na irregularidade dos níveis glicêmicos (BAKHTI; BÖTTCHER; LICKERT, 2019; JNEID et al., 2017; RASOULPOOR et al., 2021). Dentre as complicações mais frequentes da DM, o desenvolvimento de úlcera no pé diabético (UPD) está relacionado à alta morbidade e pode levar a amputações. A UPD está ligada a vários fatores, como a alta pressão plantar, neuropatia e déficit vascular periférico (SHANMUGAM, 2013). Muitos

estudos têm relatado que as espécies de *Candida* são as leveduras mais encontradas em UPD. A infecção é preocupante, visto que há redução circulatória nos microvasos, resultante de altas taxas de índice glicêmico por tempo prolongado. O que diminui o contato direto dos fagócitos dificultando a resposta imune, assim como a ação dos antibióticos no local da ferida, acarretando o agravamento substancial (HASSAN et al., 2019; JNEID et al., 2017; RASOULPOOR et al., 2021).

Dependendo da localização onde microrganismos colonizam é possível visualizar a olho nu, por causa do desenvolvimento de múltiplas camadas, semelhante a um biofilme extracelular (JAMES et al., 2008). A utilização de antibióticos tem como finalidade impedir a contaminação cruzada e reduzir o tempo de cicatrização. Entretanto, a concentração e a utilização inadequada de antibióticos aumenta o risco do surgimento de microrganismos resistentes ao longo do tempo de uso (HASSAN et al., 2019). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado diminuem os custos em saúde, mortalidade e amputações relacionadas a infecções das feridas do tipo UPD (RASOULPOOR et al., 2021).

Uma dessas alternativas de tratamento para atender as demandas supracitadas é a Terapia Fotodinâmica (PDT), também conhecida como Quimioterapia Antimicrobiana Fotodinâmica (PACT), caracterizada pela utilização de uma fonte de luz, com comprimento de onda visível associado a um agente fotossensibilizador (PS), não tóxico (DA SILVA et al., 2018; WIENCH et al., 2019). Quando o PS sofre fotoativação, ou seja, é exposto à luz com comprimento adequado, apresenta propriedades microbicidas devido a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) de curta duração (BOLUKI et al., 2017; MAHMOUDI et al., 2019; ZHANG et al., 2015). O PS quando excitado inicia uma cascata de reações que tem como resultado a transição quântica do oxigênio para o estado tripleto excitado, que proporciona a conversão em um singleto. O oxigênio em tais condições possui o caráter citotóxico, gerando danos irreversíveis nas estruturas celulares, como a membrana celular e o DNA, acarretando sua apoptose (MAHMOUDI et al., 2019; PASCOE; MAILLARD, 2021; WIENCH et al., 2019).

As propriedades antimicrobianas da PDT despertaram o interesse da comunidade científica. Dentre suas principais vantagens, encontram-se a ação imediata, acessibilidade a áreas difíceis, porém necessita ser viável a exposição aos

PSs, além de combater notadamente o microrganismo alvo, ou seja excluindo os tecidos do hospedeiro (BOLUKI et al., 2017; MAHMOUDI et al., 2019; WIENCH et al., 2019; ZHANG et al., 2015). A PDT tem como benefícios: a competência de eliminar micróbios imunorresistentes, baixa probabilidade de desenvolver resistência a tal método, alternativa para pessoas que são alérgicas ao uso de antibioticoterapia e a capacidade de reduzir a ativação dos fatores de virulência (DA SILVA et al., 2018; MAHMOUDI et al., 2019; PAPPAS et al., 2016; WIENCH et al., 2019).

Os sais de fenotiazina, como o azul de ortotoluidina (TBO) e o azul de metileno (MB), são fotossensibilizadores mais usualmente utilizados em estudos clínicos, por serem clinicamente permitidos o uso em humanos, além de demonstrarem resultados positivos em diversas condições clínicas e resultarem em mínimos danos às células humanas. O TBO possui maior afinidade com a luz vermelha (630 nm) e tem alta produtividade de oxigênio singlete (PASCOE; MAILLARD, 2021). Com base nisso, alguns estudos comprovaram seus efeitos sobre diferentes microrganismos patogênicos utilizando TBO ou MB, como *C. albicans*, além de reduzirem a criação de biofilme (MORADI ESLAMI et al., 2019; PINTO et al., 2018; ROSSETI; CHAGAS; COSTA, 2014). Ademais, uma pesquisa foi realizada avaliando a efetividade da PDT com MB ou TB teve a capacidade de reduzir a população de *C. albicans* entre 80 a 90% (CARVALHO; FELIPE; COSTA, 2009).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A PDT apresenta-se como alternativa de agente antimicrobiana, na qual tem como uma de suas variáveis a concentração PS. A quantidade de fotossensibilizante está diretamente relacionada a efetividade da terapia. A partir disso, é importante estabelecer uma padronização da dosagem mínima de PS para terapia fotodinâmica com ação antimicrobiana para *C. albicans*. Além de viabilizar o desenvolvimento de futuros estudos que abordam condições de saúde mais específicas, como o tratamento de infecções envolvendo a *Candida albicans* em UPD.

### **2.1 Hipótese**

Com base nisso, tem-se como pergunta de pesquisa “Qual a concentração inibitória mínima (MIC) dos fotossensibilizantes azul de Metileno e azul de Toluidina irradiados por um diodo emissor de luz (LED) em uma cultura in vitro de *Candida albicans*?”. Com base nisso nossa hipótese foi “azul de toluidina e azul de metileno podem ser efetivos como PS na terapia fotodinâmica como agente antimicrobiano contra o fungo *Candida albicans* em concentrações semelhantes”.

### 3 OBJETIVOS

Definir a concentração inibitória mínima (MIC) dos fotossensibilizantes azul de Metileno e azul de ortotoluidina irradiados por um diodo emissor de luz (LED) em uma cultura *in vitro* de *Candida albicans*.

Tendo como objetivos específicos:

- a) Identificar a ação microbiana do MB quando irradiado por um LED vermelho (630 nm) por 15 e 30 segundos.
- b) Identificar a ação microbiana do TBO quando irradiados por um LED vermelho (630 nm) por 15 e 30 segundos.
- c) Comprovar a extinção fúngica utilizando a MIC, sendo evidenciado por meio do plaqueamento das amostras;
- d) Determinar a concentração mínima inibitória de fotossensibilizante, azul de toluidina e azul de metileno, para que possam ter ação antimicrobiana para *C. Albicans*, quando associados a terapia fotodinâmica.

## 4 MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental *in vitro*, de análise qualitativa e cunho descritivo, que foi realizada no laboratório de ensaios em microbiologia do programa de pós-graduação em odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Foram analisadas *in vitro*, diferentes concentrações de fotossensibilizadores (PS) e durações de exposição às fontes de luz, para a inativação de microrganismos (*C. Albicans*).

### 4.1 Normas de segurança

Todos os pesquisadores envolvidos no procedimento experimental utilizaram jaleco de manga comprida, luvas cirúrgicas de látex, máscaras cirúrgicas, óculos de proteção, além de óculos escuros durante a aplicação do LED. Caso algum equipamento de proteção individual fosse danificado ou contaminado de forma visível seria substituído por outro, novo e íntegro.

Uma cabine de segurança biológica classe IIB com fluxo laminar foi utilizada durante a realização de misturas e procedimentos que tivessem risco de contaminação. Antes de utilizar a cabine de segurança foram ligadas a luz ultravioleta e o exaustor por 15 minutos, posteriormente o espaço interno foi limpo por papel toalha e álcool etílico 70%. Além disso, todo instrumento manuseado na capela foi limpo, com álcool 70%, antes e após o procedimento. Entre as manobras ocorreu a troca de luvas e a área de trabalho foi limpa, com álcool 70%, com o objetivo de reduzir o risco de contaminação entre as amostras.

### 4.2 Parâmetros da irradiação

O LED adotado, Ultrablue Plus®, de comprimento de onda de 630 nm, potência do cluster de 0,15w, tendo área de ponta de 0,38 cm<sup>2</sup>. Adotando a fórmula de fluência (J/cm<sup>2</sup>), potência (w) multiplicado pelo tempo (s) dividido pela área de irradiação (cm<sup>2</sup>), a irradiação por 30 segundos gera, aproximadamente, 11,84 J/cm<sup>2</sup>, enquanto a aplicação por 15 segundos consiste em, aproximadamente, 5,92 J/cm<sup>2</sup>.

### **4.3 Preparação dos corantes**

Azul de Metileno (NEON®) e Azul de Toluidina (NEON®) foram os corantes empregados, que possuem massa molar de 319,85 g/mol e 373,97 g/mol, respectivamente. Adotou-se 176 µM/mL como concentração inicial para cada corante presente em 5ml de água destilada estéril, isoladamente, ou seja 880 µM utilizando 0,28g de MB e 0,33g de TBO. O método de eliminação de impurezas dos corantes decorreu por filtração, utilizando filtro de agulha de 0,22 µm. Posteriormente, armazenados em tubos âmbar (5 mL) esterilizados e cobertos externamente por papel alumínio para evitar o contato com a luz.

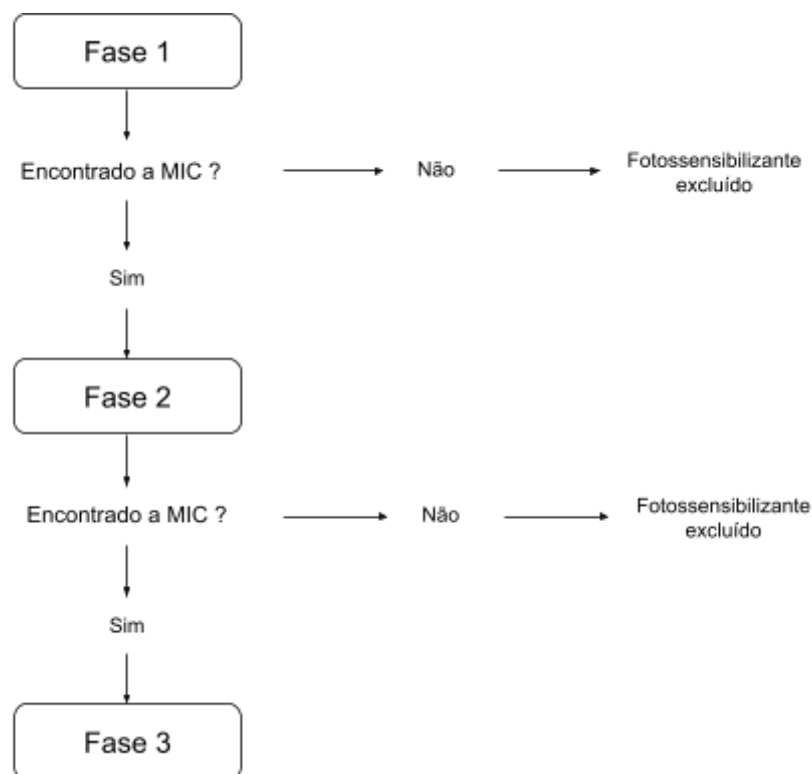
### **4.4 Ativação dos microrganismos**

A subcultura (repique) dos organismos foi manipulada em uma placa de petri com ágar Sabouraud, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade, tendo seu preparo 24 horas antes do experimento. A temperatura de incubação permaneceu fixa em 35° C.

### **4.5 Fases experimentais**

As fases experimentais seguiram as normas de referência para teste de suscetibilidade antifúngica de diluição de caldo de leveduras da Clinical Laboratory Standards Institute - M27 (CLSI-M27), a única modificação feita se deve ao meio de cultura, sendo adotada o Yeast Nitrogen Base (YNB) em vez do caldo RPMI. O experimento foi realizado de forma linear sendo subdividido em três etapas representado na figura 1. Cada fase será descrita a seguir:

FIGURA 1 - Fluxograma das fases da pesquisa



Fonte: O autor, 2021

#### 4.5.1 Fase 1

O experimento iniciou com a diluição dos corantes, MB e TBO, de forma seriada e isolada respeitando a relação 1:1, 500 $\mu$ L da solução com corante para 500 $\mu$ L de água destilada, sendo repetido tal procedimento 7 vezes com o intuito de atingir 176  $\mu$ m e seus subsequentes até 1,4  $\mu$ m. Isto significa: 176  $\mu$ M; 88  $\mu$ M; 44  $\mu$ M; 22  $\mu$ M; 11  $\mu$ M; 5,5  $\mu$ M; 2,75  $\mu$ M; 1,4  $\mu$ M. Tais soluções foram armazenadas em frascos de Eppendorf de 2mL e recobertos com papel alumínio.

A seguir, o inóculo teve seu preparado escolhendo cinco colônias com diâmetro de 1mm de cultura. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%). A suspensão resultante foi colocada em um agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular ajustada com o acréscimo de solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Esse procedimento forneceu a suspensão-padrão de levedura entre  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  células por mL. Para alcançar a suspensão de trabalho realizou uma diluição 1:100 em solução



salina, seguida de uma diluição de 1:10 em meio líquido Yeast Nitrogen Base (YNB) para alcançar a concentração alvo de  $5 \times 10^3$  ufc/mL.

Em seguida, todos os tubos de eppendorf com fotossensibilizantes, independentemente de sua concentração, receberam o acréscimo de 500  $\mu$ L do inóculo diluindo as concentrações de PSs pela metade, atingindo o pico de 88  $\mu$ M e seus subsequentes até 0,7  $\mu$ M. Tais concentrações sofreram incubação escura de 5 minutos, além de separadas amostras isoladas de *C. albicans*, YNB e PSs, das soluções fontes, com o objetivo de avaliar sua esterilidade. Após o método citado, as amostras receberam irradiação LED por 30 segundos.

Após irradiação, uma agulha foi aquecida para realizar furos nas tampas dos tubos eppendorf, com a intenção de possibilitar a troca de gases entre o meio ambiente e a solução, propiciando a respiração celular. Posteriormente, os tubos foram incubados, em uma estufa bacteriológica, por 48 horas a 35°C.

Após a incubação de 48 horas verificou-se a turvação dos tubos, caso apresentasse turbidez, seria computado como crescimento celular presente, no caso de ausência de opacidade era plaqueado os exemplares em uma placa de petri com ágar sabouraud e novamente incubados por mais 24 horas. Após a incubação era avaliado o crescimento celular das placas e tubos.

A análise dos resultados apresentados na fase 1 selecionou para a próxima fase o(s) corante(s) e concentrações que demonstraram respostas promissoras, ou seja, que não evidenciou o crescimento fúngico.

#### **4.5.2 Fase 2**

A fase 2 majoritariamente repetiu o procedimento realizado na fase 1. Entretanto, o tempo de irradiação do LED foi reduzido para 15 segundos, de forma que avaliou a efetividade da PDT em durações menores. Além disso, realizou 9 diluições seriadas do corante, anteriormente 8, ou seja foi acrescentada a concentração 0,35  $\mu$ M, tal adição teve o objetivo de aumentar a amplitude de investigação.

A análise dos resultados apresentados na fase 2 definiu a concentração inibitória mínima (MIC) expressa, ou seja, não havendo crescimento fúngico.

### **4.5.3 Fase 3**

Na fase 3, quatro grupos foram criados: o grupo PLM composto por fotossensibilizante e *C. albicans*, além de ser irradiado pelo LED por 15 segundos; o grupo PM possuiu apenas fotossensibilizante e microrganismos; grupo LM somente *C. albicans*, sendo irradiado pelo LED por 15 segundos; o grupo PY teve o YNB com fotossensibilizante. Os grupos PY, PLM e PM, que utilizam PS, adotaram 3 concentrações, a MIC, encontrada na fase anterior, e duas concentrações próximas a ela, uma superior e uma inferior.

A fase 3 continuou respeitando, predominantemente, a metodologia da fase 1, até a fase de irradiação dos eppendorf. Após a aplicação do LED, todos os grupos foram plaqueados em uma placa de petri com ágar Sabouraud e colocados em uma estufa bacteriológica a 35°C. Após 48 horas, avaliou-se a presença do crescimento fúngico em cada grupo.

### **4.6 Avaliação de crescimento e análise de dados**

O crescimento de *C. albicans* no tubos eppendorf foi avaliada por meio da análise visual antes e após ser colocado no agitador de vórtex por 5 segundos. Sendo considerado crescimento positivo a presença de turbidez na solução. A avaliação em placa de petri consistiu também por análise visual. A análise foi operada por 3 avaliadores cegos, adotando a maioria como resultado definitivo.

## 5 RESULTADOS

Após a análise qualitativa do crescimento fúngico, os avaliadores observaram que a fototerapia inibiu o crescimento fúngico. As fases II e III apresentaram resultados semelhantes.

### 5.1 Fase 1

Com relação aos grupos controles: O grupo *C. albicans* evidenciou crescimento, enquanto que YNB e corante não apresentaram crescimento.

O corante TBO em todas as concentrações não exibiu crescimento de microorganismos, por outro lado o MB apontou crescimento em todas as diluições, tais resultados são apresentados na tabela 1. Todos os plaqueamentos condizem com os resultados encontrados nos eppendorfs. Com base nisso, optou-se por dar continuidade apenas ao TBO e permanecer utilizando todas as concentrações disponíveis.

Tabela 1 - Resultados encontrados na fase 1

Grupo (TBO)	CF	Grupo (MB)	CF
88 µM	Não	88 µM	Sim
44 µM	Não	44 µM	Sim
22 µM	Não	22 µM	Sim
11 µM	Não	11 µM	Sim
5,5 µM	Não	5,5 µM	Sim
2,75 µM	Não	2,75 µM	Sim
1,4 µM	Não	1,4 µM	Sim
0,7 µM	Não	0,7 µM	Sim
Controle <i>C.albicans</i>	Sim	Controle <i>C.albicans</i>	Sim
Controle YNB	Não	Controle YNB	Não
Controle corante	Não	Controle corante	Não

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CF= Crescimento celular após tratamento

### 5.2 Fase 2

Os grupos controles de YNB e corante não apresentaram crescimento, apenas o grupo isolado de *C. albicans* evidenciou aumento da população.

No que se refere às concentrações de corantes apenas 0,35 µM resultou em proliferação fúngica, tais resultados são apresentados na tabela 2. Todos os

plaqueamentos condizem com os resultados encontrados nos eppendorfs. Fundando-se nisso, considera-se a MIC encontrada de TBO 0,7  $\mu\text{M}$ , a partir disso, foram selecionadas para a próxima fase as concentrações 1,4 $\mu\text{M}$ , 0,7  $\mu\text{M}$ , 0,35  $\mu\text{M}$ .

Tabela 2 - Resultados encontrados na fase 2

<b>Grupo (TBO)</b>	<b>CF</b>
88 $\mu\text{M}$	Não
44 $\mu\text{M}$	Não
22 $\mu\text{M}$	Não
11 $\mu\text{M}$	Não
5,5 $\mu\text{M}$	Não
2,75 $\mu\text{M}$	Não
1,4 $\mu\text{M}$	Não
0,7 $\mu\text{M}$	Não
0,35 $\mu\text{M}$	Sim
Controle <i>C.albicans</i>	Sim
Controle YNB	Não
Controle corante	Não

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CF= Crescimento celular após tratamento

### 5.3 Fase 3

Os grupos controles de YNB não apresentaram crescimento, apenas o grupo isolado de *C. albicans* evidenciou aumento da população.

As concentrações 0,7  $\mu\text{M}$  e 1,4  $\mu\text{M}$  (FIGURA 2) não evidenciaram CF em seus grupos PLM, PM e PY, sendo LM o único que resultou em crescimento celular. Com relação a concentração 0,35  $\mu\text{M}$  apenas os grupos PLM e LM manifestaram aumento da população. Tais resultados foram representados na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados encontrados na fase 3 (Continua)

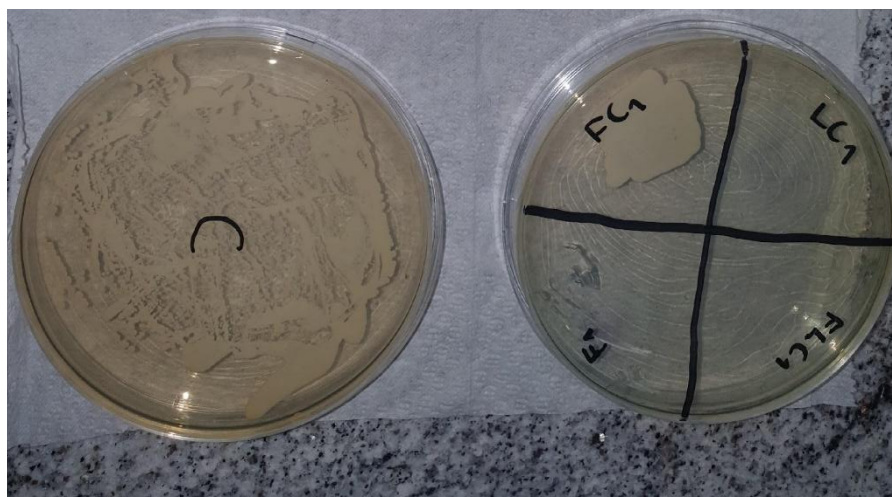
<b>Concentrações (Grupo)</b>	<b>CF</b>
1,4 $\mu\text{M}$ (PLM)	Não
1,4 $\mu\text{M}$ (LM)	Sim
1,4 $\mu\text{M}$ (PM)	Não
1,4 $\mu\text{M}$ (PY)	Não
0,7 $\mu\text{M}$ (PLM)	Não
0,7 $\mu\text{M}$ (LM)	Sim
0,7 $\mu\text{M}$ (PM)	Não
0,7 $\mu\text{M}$ (PY)	Não

Tabela 3 - Resultados encontrados na fase 3 (Continuação)

0,35 $\mu$ M (PLM)	Sim
0,35 $\mu$ M (LM)	Sim
0,35 $\mu$ M (PM)	Não
0,35 $\mu$ M (PY)	Não
Controle <i>C.albicans</i>	Sim
Controle YNB	Não

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CF= Crescimento celular após tratamento

Figura 2 - Concentração de 1,4  $\mu$ M de TBO na fase 3

Fonte: O Autor, 2022.

Legenda: C= Controle de *Candida Albicans*; FC<sub>1</sub>(Grupo LM)= *C. albicans* irradiado pelo LED por 15 segundos; LC<sub>1</sub> (Grupo PM) = Fotosensibilizante e microrganismos; FLC<sub>1</sub> (Grupo PLM)= *C. albicans* com fotossensibilizante irradiado pelo LED; F<sub>4</sub> (grupo PY) = YNB com fotossensibilizante.

## 6 DISCUSSÃO

A *C. Albicans* pode levar a infecções profundas e gastos elevados em saúde. Uma vez que esse microrganismo está presente na microflora humana, aproveita-se de uma doença de base que atua sobre o sistema imunológico para apresentar-se patogênico. Por outro lado, a PDT possui efeitos antimicrobianos, com evidências relacionadas no tratamento de microorganismos multirresistentes, incluindo a *Candida Albicans* (MAHMOUDI et al., 2019; PINTO et al., 2018; WIENCH et al., 2019). O objetivo deste trabalho foi definir a concentração inibitória mínima (MIC) dos fotossensibilizantes azul de Metileno e azul de ortotoluidina irradiados por um diodo emissor de luz (LED) em uma cultura *in vitro* de *Candida albicans*. Os achados mostraram que a PDT aplicada por 15 (5,92 J/cm<sup>2</sup>) ou 30 segundos (11,84 J/cm<sup>2</sup>), em azul de ortotoluidina, foram eficazes para impedir o crescimento do fungo.

Os resultados deste estudo foram semelhantes aos de BARBÉRIO et al. (2013) que utilizaram combinação de 0,05 mg/mL (1,35 µM/mL) de azul de toluidina (TBO), durante 1 minuto de aplicação, com um emissor LED de luz vermelha (18 J/cm<sup>2</sup>), obtendo efeitos fungicidas estatisticamente significativos (BARBÉRIO et al., 2013). Evidências relacionadas ao PACT de 630 nm utilizando o TBO também demonstraram inibição da formação do biofilme precoce e maduro produzido pela *C. Albicans*, além de atuar sobre a diminuição do número de células e formas filamentosas presentes na estrutura do biofilme (PINTO et al., 2018).

Resultados promissores também foram encontrados por Freire, Ferraresi et al. (2016) ao utilizar Iodeto de Potássio (KI) associado a MB e laser vermelho (660 nm), com dose de 40 J, reduziu a concentração fúngica log *in vitro* de UFC/ml. Nesse estudo, em apenas 5 dias de tratamento, os ratos com infecção oral por *Candida* estavam curados, sinalizando assim que a PDT pode tornar-se uma nova abordagem para o tratamento (FREIRE et al., 2016).

Ensaio *in vivo* apresentaram efeitos antifúngicos eficientes quando comparados à nistatina e quitosana, embora os achados não foram estatisticamente significativos. Trinta e cinco camundongos imunossuprimidos DBA/2 foram inoculados oralmente com uma suspensão de *C. albicans*. A aplicação de PDT Led Vermelho durante 1 minuto, associado a quitosana reduziu significativamente o

número de unidades formadoras de colônias por mililitro ( $p = 0,046$ ), embora não apresentou diferenças significativas em outros grupos de tratamento. Na análise do tecido conjuntivo, houve menor presença de células inflamatórias em animais tratados com PDT quando comparado a outros grupos ( $p = 0,024$ ) (FABIO et al., 2016).

Um estudo que utilizou a PDT baseada em fotopolimerização de LEDs azuis (440-460 nm) das unidades combinados a uma composição reveladora de placas (5% de eritrosina) contra *C. albicans* em cultura e modelo murino de candidíase oral ( $n = 40$ ), obteve resultados *in vitro* promissores, com inativação de células *C. Albicans* com dose de luz de  $28,8 \text{ J/cm}^2$  associada a eritrosina 5%, durante 3 minutos de aplicação, testado em cepas padrão e resistente. Todavia, nos ensaios *in vivo*, o LED azul não foi capaz de reduzir a colonização fúngica ou inflamação de lesões experimentais de candidíase oral. Os autores sugerem outros parâmetros para a utilização deste tipo de fototerapia, com análise de fatores relacionados à fotodegradação (SILVA et al., 2017).

Os efeitos do LED de luz vermelha foram testados em outras espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Houve eficácia na inibição do crescimento de todas as espécies (PINTO et al., 2018; WIENCH et al., 2019). O azul de toluidina foi analisado como fotossensibilizador no crescimento e formação de biofilme por *Candida krusei*, associado ao LED vermelho. A PACT foi capaz de reduzir o crescimento celular e formação de biofilme por *C. Krusei*, o que comprovou os efeitos antimicrobianos da PDT (SILVA et al., 2018).

O presente estudo teve como limitação a baixa reprodução do experimento, sendo executado apenas uma vez, apesar dos procedimentos de controle, visando evidenciar contaminações durante as etapas, surge a incerteza dos resultados encontrados. Com base nisso, novos estudos são necessários para comprovar os resultados encontrados neste trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostram o potencial terapêutico da PDT no tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. Albicans*. Além de comprovar a eficácia do fotossensibilizante, azul de ortotoluidina, em baixas concentrações e em curto período de tempo de aplicação do LED. Assim, sugere-se novas investigações, especialmente em multiespécies e expansão do estudo para cepas clínicas, como potencial tratamento para infecções em UPD.



## REFERÊNCIAS

ALBATAINEH, Mohammad T.; SUTTON, Deanna A.; FOTHERGILL, Annette W.; WIEDERHOLD, Nathan P. Update from the Laboratory. **Infectious Disease Clinics of North America**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 13–35, 2016. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552015001154>.

BAKHTI, Mostafa; BÖTTCHER, Anika; LICKERT, Heiko. Modelling the endocrine pancreas in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 155–171, 2019. DOI: 10.1038/s41574-018-0132-z. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41574-018-0132-z>.

BARBÉRIO, Gabriel Salles; DA COSTA, Soraia Veloso; DOS SANTOS SILVA, Mariana; DE OLIVEIRA, Thaís Marchini; SILVA, Thiago Cruvinel; DE ANDRADE MOREIRA MACHADO, Maria Aparecida. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* mediated by a low density of light energy, **Lasers in Medical Science**, 2013. DOI: 10.1007/s10103-013-1295-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-013-1295-4>.

BOLUKI, Ebrahim; KAZEMIAN, Hossein; PEERIDOGAHEH, Hadi; ALIKHANI, Mohammad Yousef; SHAHABI, Sima; BEYTOLLAHI, Leili; GHORBANZADEH, Roghayeh. Antimicrobial activity of photodynamic therapy in combination with colistin against a pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patient. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 18, p. 1–5, 2017. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100016302617>.

CARVALHO, Gabriela Guimarães; FELIPE, Monalisa Poliana; COSTA, Maricília Silva. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. **The Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 619–623, 2009. DOI: 10.1007/s12275-009-0059-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12275-009-0059-0>.

CLIFF, P. R.; SANDOE, J. A. T.; HERITAGE, J.; BARTON, R. C. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. **Journal of Hospital Infection**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 24–32, 2008. DOI: 10.1016/j.jhin.2008.02.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670108000807>.

DADAR, Maryam; TIWARI, Ruchi; KARTHIK, Kumaragurubaran; CHAKRABORTY, Sandip; SHAHALI, Youcef; DHAMA, Kuldeep. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 117, p. 128–138, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017317175>.

DENNING, David W.; KNEALE, Matthew; SOBEL, Jack D.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina. Global burden of recurrent vulvovaginal

candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. e339–e347, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30103-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918301038>.

FABIO, Camacho-Alonso; YOLANDA, Martínez-Beneyto; CARMEN, Gallego M<sup>a</sup>; FRANCISCO, Cuello; ANTONIO JULIÁN, Buendía; LEONOR, Pérez-Lajarin; JESÚS, Salinas. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of *Candida albicans* in a murine model. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 45, n. 8, p. 627–633, 2016. DOI: 10.1111/jop.12435. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jop.12435>.

FREIRE, Fernanda; FERRARESI, Cleber; JORGE, Antonio Olavo C.; HAMBLIN, Michael R. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 159, p. 161–168, 2016. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134416301464>.

GONÇALVES, Bruna; FERREIRA, Carina; ALVES, Carlos Tiago; HENRIQUES, Mariana; AZEREDO, Joana; SILVA, Sónia. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 905–927, 2016. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1091805. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2015.1091805>.

HASSAN, Mohamed A.; TAMER, Tamer M.; RAGEH, Asmaa A.; ABOU-ZEID, Alaa M.; ABD EL-ZAHER, Eman H. F.; KENAWY, El-Refaie. Insight into multidrug-resistant microorganisms from microbial infected diabetic foot ulcers. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 1261–1270, 2019. DOI: 10.1016/j.dsx.2019.01.044. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402119300128>.

JAMES, Garth A.; SWIGGER, Ellen; WOLCOTT, Randall; PULCINI, Elinor deLancey; SECOR, Patrick; SESTRICH, Jennifer; COSTERTON, John W.; STEWART, Philip S. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 37–44, 2008. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>.  
JNEID, J.; LAVIGNE, J. P.; LA SCOLA, B.; CASSIR, N. The diabetic foot microbiota: A review. **Human Microbiome Journal**, [S. l.], v. 5–6, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1016/j.humic.2017.09.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452231717300076>.

MAHMOUDI, Hassan; POURHAJIBAGHER, Maryam; ALIKHANI, Mohammad Yousef; BAHADOR, Abbas. The effect of antimicrobial photodynamic therapy on the expression of biofilm associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound infections in burn patients. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 25, p. 406–413, 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100018304113>.

MORADI ESLAMI, Leila; VATANPOUR, Mehdi; AMINZADEH, Neda; MEHRVARZ FAR, Payman; TAHERI, Soudabeh. The comparison of intracanal

medicaments, diode laser and photodynamic therapy on removing the biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the root canal system (ex-vivo study). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. I.], v. 26, p. 157–161, 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.033. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100018302138>.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [S. I.], v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016. DOI: 10.1093/cid/civ933. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/62/4/e1/2462830>.

PASCOE, M. J.; MAILLARD, J. -Y. The role of melanin in *Aspergillus* tolerance to biocides and photosensitizers. **Letters in Applied Microbiology**, [S. I.], v. 72, n. 4, p. 375–381, 2021. DOI: 10.1111/lam.13437. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13437>.

PINTO, Ana Paula; ROSSETI, Isabela Bueno; CARVALHO, Moisés Lopes; DA SILVA, Bruna Grazielle Marques; ALBERTO-SILVA, Carlos; COSTA, Maricilia Silva. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue O inhibits the viability of biofilm produced by *Candida albicans* at different stages of development. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. I.], v. 21, p. 182–189, 2018. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100017304386>.

POULAIN, Daniel. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. I.], v. 41, n. 2, p. 208–217, 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2013.813904. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.813904>.

RASOULPOOR, Shna; SHOHAIMI, Shamarina; SALARI, Nader; VAISI-RAYGANI, Aliakbar; RASOULPOOR, Shabnam; SHABANI, Shervin; JALALI, Rostam; MOHAMMADI, Masoud. *Candida albicans* skin infection in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, [S. I.], v. 20, n. 1, p. 665–672, 2021. DOI: 10.1007/s40200-021-00797-0. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s40200-021-00797-0>.

ROSSETI, Isabela Bueno; CHAGAS, Luciene Reginato; COSTA, Maricilia Silva. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Lasers in Medical Science**, [S. I.], v. 29, n. 3, p. 1059–1064, 2014. DOI: 10.1007/s10103-013-1473-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-013-1473-4>.

SHANMUGAM, Priyadarshini. The Bacteriology of Diabetic Foot Ulcers, with a Special Reference to Multidrug Resistant Strains **JOURNAL of CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2013. DOI: 10.7860/JCDR/2013/5091.2794. Disponível em: [http://www.jcdr.net/article\\_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2013&month=March&volume=7&issue=3&page=441-445&id=2794](http://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2013&month=March&volume=7&issue=3&page=441-445&id=2794).

SILVA, Bruna Grazielle Marques; CARVALHO, Moisés Lopes; ROSSETI, Isabela Bueno; ZAMUNER, Stella; COSTA, Maricilia Silva. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using toluidine blue inhibits both growth and biofilm formation by *Candida krusei*. **Lasers in Medical Science**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 983–990, 2018. DOI: 10.1007/s10103-017-2428-y. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-017-2428-y>.

SILVA, Nathalia Ramos; RIBEIRO, Daniela Garcia; ISSA, João Paulo Mardegan; BONFÁ, Karla; MENEZES, Michelli Sobreiro; OLIVEIRA, Viviane de Cássia; SOUZA, Raphael Freitas. Preclinical study of a cost-effective photodynamic therapy protocol for treating oral candidoses. **Lasers in Medical Science**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1253–1260, 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2228-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-017-2228-4>.

WIENCH, Rafał; SKABA, Dariusz; STEFANIK, Natalia; KĘPA, Małgorzata; GIŁOWSKI, Łukasz; CIEŚLAR, Grzegorz; KAWCZYK-KRUPKA, Aleksandra. Assessment of sensitivity of selected *Candida* strains on antimicrobial photodynamic therapy using diode laser 635 nm and toluidine blue – In vitro research. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 27, p. 241–247, 2019. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.06.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100019301383>.

ZHANG, Yunsong; DAI, Tianhong; WANG, Min; VECCHIO, Daniela; CHIANG, Long Y.; HAMBLIN, Michael R. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: in vitro and in vivo studies. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 603–614, 2015. DOI: 10.2217/nnm.14.131. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm.14.131>.