

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TALITA PEREIRA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBIOFILME DA
TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR
NANOEMULSÃO DE CLORETO DE
ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM MODELOS COM
*CANDIDA ALBICANS***

BRASÍLIA, DF

2025

Talita Pereira Gonçalves

**Avaliação do efeito antibiofilme da terapia fotodinâmica
mediada por nanoemulsão de cloreto de
alumínio-ftalocianina em modelos com *Candida albicans***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Professor Doutor Luis Alexandre Muehlmann

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas

Brasília, DF

2025

*"Às pessoas que olham para as estrelas e desejam. . .
Às estrelas que ouvem e aos sonhos que são atendidos."*

Resumo

A espécie *Candida albicans* é um patógeno oportunista responsável pela maioria das infecções fúngicas em humanos. Esse fungo pode ser encontrado em biofilmes os quais, em relação às células planctônicas, são mais resistentes a antifúngicos e dificultam o tratamento da candidíase. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma abordagem que consiste na geração de espécies reativas de oxigênio por meio da excitação de um fotossensibilizador com luz. O aprimoramento de fotossensibilizadores pode ser feito com nanotecnologia, como o aumento da atividade de derivados de ftalocianina em meios aquosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc) contra biofilmes de *C. albicans*. O estabelecimento do biofilme maduro foi padronizado por meio de testes com diferentes tempos de incubação, concentrações de células e condições de cultivo. Biofilmes padronizados foram expostos por 30 min a concentrações de 20000 nM a 39 nM, com posterior irradiação a 108 J/cm², 30 min, de LED 660 nm construído no Instituto de Física da Universidade de Brasília. A viabilidade desses biofilmes foi avaliada por ensaio colorimétrico da resazurina e contagem de unidades formadoras de colônia. A análise estatística apontou que os biofilmes não expostos ao LED tiveram viabilidade igual à do controle de crescimento fúngico. Enquanto os biofilmes expostos à TFD mediada por NEAlPc em concentração de 625 nM tiveram redução de 80% em sua viabilidade. Somado a isso, a TFD foi estatisticamente significativa para a redução da viabilidade dos biofilmes de *C. albicans*. Assim, os resultados deste trabalho sugerem que a TFD mediada por NEAlPc é uma alternativa de combate a biofilmes de *Candida albicans*.

Palavras-chaves: nanotecnologia, candidíase, LED, biofilme, estresse oxidativo.

Abstract

The species *Candida albicans* is an opportunistic pathogen responsible for most fungal infections in humans. This fungus can be found in biofilms, which, compared to planktonic cells, are more resistant to antifungals and complicate the treatment of candidiasis. Photodynamic therapy (PDT) is an approach that involves the generation of reactive oxygen species by exciting a photosensitizer with light. The enhancement of photosensitizers can be achieved using nanotechnology, such as increasing the activity of phthalocyanine derivatives in aqueous media. The aim of this study was to evaluate the effect of photodynamic therapy mediated by aluminum phthalocyanine chloride nanoemulsion (NEAlPc) against *C. albicans* biofilms. The establishment of mature biofilms was standardized through tests with different incubation times, cell concentrations, and culture conditions. Standardized biofilms were exposed for 30 minutes to concentrations ranging from 20000 nM to 39 nM, followed by irradiation at 108 J/cm² for 30 minutes using a 660 nm LED constructed at the Institute of Physics at the University of Brasília. The viability of these biofilms was assessed using a resazurin colorimetric assay and colony-forming unit counting. Statistical analysis indicated that biofilms not exposed to LED had the same viability as the fungal growth control. In contrast, biofilms exposed to PDT mediated by NEAlPc at a concentration of 625 nM showed an 80% reduction in viability. Additionally, PDT was statistically significant in reducing the viability of *C. albicans* biofilms. Thus, the results of this study suggest that PDT mediated by NEAlPc is an alternative approach for combating *Candida albicans* biofilms.

Keywords: nanotechnology, candidiasis, LED, biofilm, oxidative stress.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Células de levedura de <i>Candida albicans</i>	17
Figura 2 – Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica por meio do diagrama de Jablonski.	21
Figura 3 – Lavagem do inóculo de <i>Candida albicans</i> SC5314 em meio <i>Sabouraud</i> dextrose.	33
Figura 4 – Distribuição das condições testadas em biofilmes otimizados na placa de 96 poços em quadruplicata.	37
Figura 5 – Semeadura de <i>Candida albicans</i> SC5314 em placa de Petri com meio <i>Sabouraud</i> dextrose ágar (SDA).	38
Figura 6 – Placas de 96 poços identificadas contendo soro fetal bovino (SFB). . . .	39
Figura 7 – Placas de 96 poços contendo biofilmes de <i>Candida albicans</i> SC5314 após lavagem.	39
Figura 8 – Estoque da nanoemulsão contendo ALPc na concentração de 40 μ M. . .	41
Figura 9 – Equipamento LED de 660 nm criado no Laboratório de Instrumentação e Software do Instituto de Física da Universidade de Brasília.	42
Figura 10 – Inativação fotodinâmica pela irradiação da luz LED 660 nm em uma placa "LED".	43
Figura 11 – Estrutura dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em 24 e 48 horas com diferentes concentrações iniciais de células ($1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ células/mL) em placas de 96 poços.	46
Figura 12 – Viabilidade pelo método XTT dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> formados em 24 e 48 horas com diferentes concentrações iniciais de células ($1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ células/mL), nas condições de controle de crescimento fúngico (NT) e exposto à anfotericina B a 1 μ g/mL (AnB). . .	47
Figura 13 – Estrutura de biofilmes de 24 horas formados a partir da concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ células/mL testando a exposição ao soro fetal bovino (SFB).	49
Figura 14 – Ensaio de viabilidade de biofilmes de <i>Candida albicans</i> pelos métodos colorimétricos da resazurina e do XTT.	50
Figura 15 – Viabilidade dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> determinada pelos ensaios colorimétricos de XTT (laranja) e resazurina (azul) em diferentes condições experimentais: sem soro (NT: controle de crescimento fúngico e AnB: exposto à anfotericina B a 1 μ g/mL) e em poços previamente expostos ao soro fetal bovino (SFB-NT: controle de crescimento fúngico e SFB-AnB: exposto à anfotericina B).	51

Figura 16 – Viabilidade pelo método da resazurina dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> expostos à anfotericina B em concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ (AnB-2) e de 4 $\mu\text{g/mL}$ (AnB-4) por 30 minutos.	53
Figura 17 – Ensaio de concentração de anfotericina B (AnB) para exposição por 30 minutos.	54
Figura 18 – Comparação do desenvolvimento de biofilmes de <i>Candida albicans</i> SC5314 em placas de 96 poços das marcas <i>Corning</i> (A e B) e <i>Kasvi</i> (C e D).	55
Figura 19 – Ensaio de viabilidade dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> SC5314 avaliada pelo método da resazurina após terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc).	57
Figura 20 – Ensaio de viabilidade dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> SC5314 avaliada pelo método da resazurina após terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc).	59
Figura 21 – Viabilidade pelo método da resazurina de biofilmes de <i>Candida albicans</i> expostos a cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc), em nanoemulsão, no escuro (linha preta) ou sob irradiação com luz vermelha (λ 660 nm, 108 J/cm ²) em protocolo de terapia fotodinâmica (TFD, linha azul).	60
Figura 22 – Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de biofilmes de <i>Candida albicans</i> após exposição à nanoemulsão (NE) contendo cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc) no escuro (linha preta) ou sob irradiação com luz vermelha (λ 660 nm, 108 J/cm ²) em protocolo de terapia fotodinâmica (TFD, linha azul).	61

Lista de tabelas

Tabela 1 – Reagentes utilizados para realização dos experimentos.	29
Tabela 2 – Materiais utilizados para realização dos experimentos.	30
Tabela 3 – Equipamentos utilizados para realização dos experimentos.	30

Lista de abreviaturas e siglas

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete
2×	Duas Vezes mais Concentrado
AlPc	Cloreto de Alumínio Ftalocianina
AnB	Anfotericina B
ASC	Área Sob a Curva
aTFD	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
BALB/c	Linha de Camundongos Albinos Livres de Patógenos
cm	Centímetro
células/mL	Células por Mililitro
Dr.	Doutor
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
e^-	Elétron
FS	Fotossensibilizador
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
h	Horas
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
IB	Instituto de Ciências Biológicas
IF	Instituto de Física
J	<i>Joule</i>
KCl	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	Fosfato Monopotássico
LBMFP	Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos
LED	Diodo Emissor de Luz

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mV	Milivolt
mW	Miliwatt
min	Minutos
MOPS	3-[N-Morpholino] propano sulfônico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Dissódico
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD(P)H	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Fosfato) Hidrogênio
NE	Nanoemulsão
NEAlPc	Nanoemulsão de Cloreto de Alumínio-Ftalocianina
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NT	Controle de Crescimento Fúngico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
PBS	Solução Tampão Fosfato
Pc	Ftalocianina
Prof.	Professor
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
SFB	Soro Fetal Bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta

UnB	Universidade de Brasília
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
$\bullet\text{OH}$	Radical Hidroxila

Sumário

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1	<i>Candida albicans</i>	17
1.1.1	Transição comensal para patógeno	18
1.2	Biofilme de <i>Candida albicans</i>	18
1.3	Terapia fotodinâmica (TFD)	19
1.3.1	Reação fotodinâmica	20
1.3.2	Espécies reativas de oxigênio (EROs)	21
1.3.3	Fotossensibilizador (FS)	22
1.3.3.1	Ftalocianina (Pc)	22
1.3.3.2	Nanotecnologia na TFD	23
1.3.3.3	Nanoemulsões (NE)	23
1.3.4	Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc)	24
1.3.5	Dispositivos de fonte de luz	25
1.3.6	Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD)	25
2	JUSTIFICATIVA	27
2.1	Objetivos	27
2.1.1	Geral	27
2.1.2	Específicos	27
3	MÉTODO	29
3.1	Reagentes, materiais e equipamentos	29
3.2	Obtenção de biofilme de <i>Candida albicans</i> SC5314	29
3.2.1	Meios de cultura e tampão	31
3.2.2	Manutenção celular	31
3.2.3	Padronização de tempo e de concentração de células	31
3.2.4	Padronização do biofilme mediante à exposição ao soro fetal bovino e padronização da avaliação de viabilidade pelo método da resazurina	34
3.3	Padronização da TFD	35
3.3.1	Padronização da concentração de anfotericina B	36
3.3.2	Padronização de biofilmes em microplaca de 96 poços	36
3.4	Experimentos biológicos com biofilme previamente padronizado	36
3.4.1	Estabelecimento do biofilme	37
3.4.2	Protocolo de terapia fotodinâmica (TFD)	39
3.5	Ensaio de viabilidade celular	43
3.5.1	Método colorimétrico da resazurina	43

3.5.2	Contagem de unidades formadoras de colônia	44
3.6	Análise de dados	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Padronizações	45
4.1.1	Formação de biofilme	45
4.1.2	Soro fetal bovino e avaliação colorimétrica	48
4.1.3	Anfotericina B	52
4.1.4	Marcas de placas de poliestireno	54
4.2	TFD em biofilmes de <i>Candida albicans</i>	55
5	CONCLUSÃO	63
5.1	Perspectivas	63
	REFERÊNCIAS	65

1 Revisão bibliográfica

1.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* faz parte do filo Ascomycota e é tipicamente formado por leveduras comensais eucarióticas inofensivas, que podem ser encontradas em fontes ambientais e mamíferos, incluindo humanos (McManus; Coleman, 2014). Entre as espécies de *Candida spp.*, a mais encontrada em associação com humanos é a *C. albicans*, com prevalência em pessoas imunocomprometidas ou hospitalizadas (Odds, 1987; Macias-Paz *et al.*, 2023). Frequentemente, esta está localizada na microbiota de superfícies de mucosas, como trato geniturinário, trato gastrointestinal e pele (Kumamoto, 2011).

A *C. albicans* é uma espécie dimórfica, ou seja, é capaz de estar em diferentes fases biológicas, em forma de levedura e em formas filamentosas, como pseudo-hifas e hifas verdadeiras (Asmundsdóttir *et al.*, 2009). As células de levedura ou blastóforo são arredondadas ou ovais (Figura 1) e possuem brotos-filhos fisicamente separados na célula-mãe. Enquanto as pseudo-hifas mostram alongamentos em diversos graus, mas com constrição entre compartimentos de células. Além disso, as hifas verdadeiras são tubos longos sem essas constrições (Sudbery, 2001).

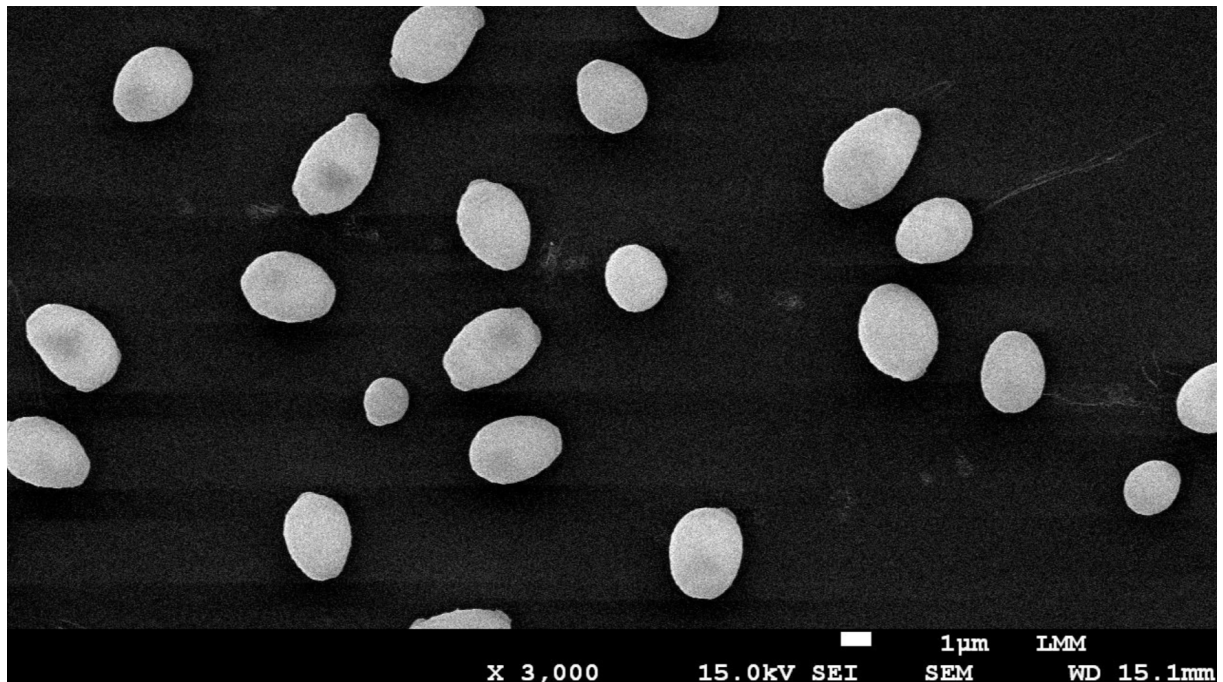


Figura 1 – Células de levedura de *Candida albicans*. Imagem de microscopia eletrônica de varredura realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade de Brasília, durante disciplina acadêmica de MEV. Barra de escala branca representa 1 μm .

1.1.1 Transição comensal para patógeno

Apesar da diferenciação das fases biológicas, as populações de *C. albicans* normalmente são encontradas com mistura entre essas morfologias. O equilíbrio entre essas formas influencia as características da colônia, além de afetar a expressão gênica, permitindo adaptação a uma variedade de ambientes microecológicos (Slutsky *et al.*, 1987). Essa resposta à variação das condições ambientais também está associada à transição comensal para patógeno, a qual consiste na mudança das interações entre o fungo e o hospedeiro. Esse processo ativo exige não somente uma redução na defesa do hospedeiro, mas também alterações transcricionais fúngicas que culminam no preparo das células para infecção (Hube, 2004).

A adesão de *C. albicans* é fundamental para uma colonização persistente, por exemplo, na cavidade oral em que há constante fluxo salivar. Essa adesão ocorre principalmente em células epiteliais não viáveis e não é suficiente para causar danos ao tecido (Samaranayake; MacFarlane, 1981), mas pode ser considerada a primeira etapa da infecção. Posteriormente, a invasão de células epiteliais pode ser feita por endocitose induzida ou penetração ativa pelo fungo. No último caso, é necessária a formação de hifas que aumentam a expressão de genes de virulência. Assim, há maior produção de fatores de adesão, por exemplo, sequências semelhantes à aglutinina, e de enzimas de dissolução de membranas celulares, como proteases aspárticas (Chen *et al.*, 2020).

Outrossim, a filamentação é crítica para os danos causados às células epiteliais, porque, além de ruptura mecânica devido à perfuração pelas hifas, estas são capazes de escapar de células do sistema imunitário (Jacobsen, 2023). Tal fato é visto em dois mecanismos usados por *C. albicans* para combater macrófagos: a proliferação robusta de hifas que podem perfurar a célula e a ativação de morte celular programada piroptótica (Uwamahoro *et al.*, 2014). A filamentação é descrita como uma das principais razões de virulência, sendo uma maneira de comparação entre *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, junto à disseminação pelo organismo (Stokes *et al.*, 2007). Embora a formação de hifas seja importante para a virulência, a presença de células leveduriformes também é necessária. Tal fato é ratificado na diminuição da virulência em linhagens mutantes hiperfilamentosas de *C. albicans* (Mitchell, 1998).

1.2 Biofilme de *Candida albicans*

Biofilmes são definidos como populações de células microbianas envoltas por uma matriz. Estas células estão aderidas umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces líquido-ar. Também possuem propriedades distintas que suas contrapartes não sésseis (planctônicas) (Costerton *et al.*, 1995). Dito isso, um biofilme de *C. albicans* é composto por uma mistura de levedura, de pseudo-hifas e de células hifais cercadas por uma matriz extrace-

lular. Este pode se formar em dispositivos médicos e em superfícies do hospedeiro, como mucosas, células epiteliais e órgãos parenquimatosos (Kojic; Darouiche, 2004).

Em consonância, estima-se que 80% das infecções humanas causadas por micro-organismos estejam associadas a biofilmes, assim como espécies de *Candida spp.* são as prevalentes entre os fungos isolados de dispositivos médicos (Nobile; Johnson, 2015). As células fúngicas em biofilmes podem apresentar características que contribuem para a resistência a fármacos de biofilmes. Entre elas, têm-se mudanças na composição da membrana e da parede celular e nos perfis de resposta ao estresse, além da superexpressão de bombas de efluxo (Revie *et al.*, 2018). Essas células resistentes podem se desprender, proliferar e semear outros lugares, como a corrente sanguínea (Lohse *et al.*, 2018).

Além destes mecanismos de resistência, a própria matriz do biofilme é um fator crucial na sobrevivência das células. Essa matriz extracelular permite que os fungos não sejam amplamente atacados pelo sistema imunitário do hospedeiro, como neutrófilos (Johnson *et al.*, 2016). Outrossim, biofilmes de *C. albicans* suportam concentrações exponencialmente maiores de antifúngicos quando comparados às células planctônicas (Ramage *et al.*, 2002). Tal fato está relacionado à abundância da matriz extracelular, pois a redução nos níveis da matriz aumenta a suscetibilidade do fungo (Al-Fattani; Douglas, 2006).

A resistência às moléculas antifúngicas existentes e o aumento de infecções fúngicas trazem a necessidade de novos medicamentos (Yapar, 2014). No entanto, os altos custos e longos prazos para o desenvolvimento de novos fármacos implicam em menos investimento nessa área da saúde, principalmente, quando não há garantias de um retorno financeiro significativo (Fisher *et al.*, 2022). Felizmente, houve um aumento expressivo em pesquisas para melhor compreensão de biofilmes de *Candida spp.*, o que amplia oportunidades de geração e de aprimoramento de novas terapias para o combate a infecções causadas por estes fungos (Ajetunmobi *et al.*, 2023).

1.3 Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD foi descoberta de maneira acidental nos anos 1900 por Oscar Raab, o qual descreveu a morte de paramécios em virtude de exposição a um corante de acridina junto à luz (Dougherty, 1987). O termo TFD foi cunhado em 1907 e, embora no início do século XX tenha sido usada no tratamento de câncer de pele (Tappeiner; Jodlbauer, 1907), a TFD não se popularizou até 1970 com trabalhos de Dougherty envolvendo porfirina. Tais pesquisas impulsionaram a criação e o comércio de um medicamento fotossensibilizante, valorizando essa terapia na oncologia (Ron; Moghissi, 2013).

A TFD é uma abordagem terapêutica composta por três componentes que, separadamente, são inofensivos, mas unidos geram espécies reativas de oxigênio (EROs): luz visível ou infravermelha próxima, oxigênio e fotossensibilizador (FS) (Tegos *et al.*, 2012). O processo fotodinâmico envolve reações fotoquímicas providas da ativação do FS por meio da luz, sendo este capaz de absorver e transferir energia ou elétrons para o oxigênio molecular, ocasionando a geração de EROs no local a ser tratado (Dougherty; Marcus, 1992).

1.3.1 Reação fotodinâmica

A reação fotodinâmica possui fundamentalmente dois mecanismos, os quais dependem de moléculas de oxigênio. Em ambos, primeiramente, o FS é irradiado por um comprimento de onda específico, permitindo a absorção de energia, convertendo-se do estado de energia básica para um estado singlete excitado. Posteriormente, o FS pode ir a outro estado excitado, o tripleto (Figura 2), que possui menos energia, porém uma vida útil maior, de microssegundos (10^{-6} s) ao invés de nanossegundos (10^{-9} s) (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Quimicamente, isso se deve às ligações duplas conjugadas presentes nos fotossensibilizadores, em que, no estado fundamental singlete, estão com os elétrons pareados por *spin* em seus orbitais. Entretanto, quando o FS é excitado ao absorver energia da luz, o elétron sofre uma mudança de orbital e converte o FS no estado singlete excitado instável. Nesse caso, pode acontecer um processo conhecido como cruzamento intersistema, no qual ocorre a reversão do *spin* daquele elétron. Devido a esse *spin* estar agora paralelo em relação ao seu antigo par, a volta a um nível de energia mais baixo não é imediata, pois precisa de uma nova mudança de orientação (Tegos *et al.*, 2012).

Neste estado tripleto excitado, o FS pode interagir com moléculas presentes no meio, inclusive com o oxigênio, que é um tripleto em seu estado fundamental. Tais interações são possíveis entre tripletos, diferentemente de tripleto com singlete. Os dois tipos de reação fotodinâmica estão definidos com base na interação primária do FS, sendo a de tipo I com o substrato (biomoléculas em geral) e a de tipo II com o oxigênio, principalmente (Foote, 1991).

As reações do tipo I envolvem a produção de radicais livres e/ou aniônicos, por meio da transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio, gerando EROs como ânion superóxido, posteriormente, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Enquanto isso, as reações do tipo II produzem essencialmente oxigênio singlete, uma forma bem reativa de vida curta, por meio de transferência de energia entre o FS tripleto e o oxigênio molecular tripleto (Figura 2) (Foote, 1976).

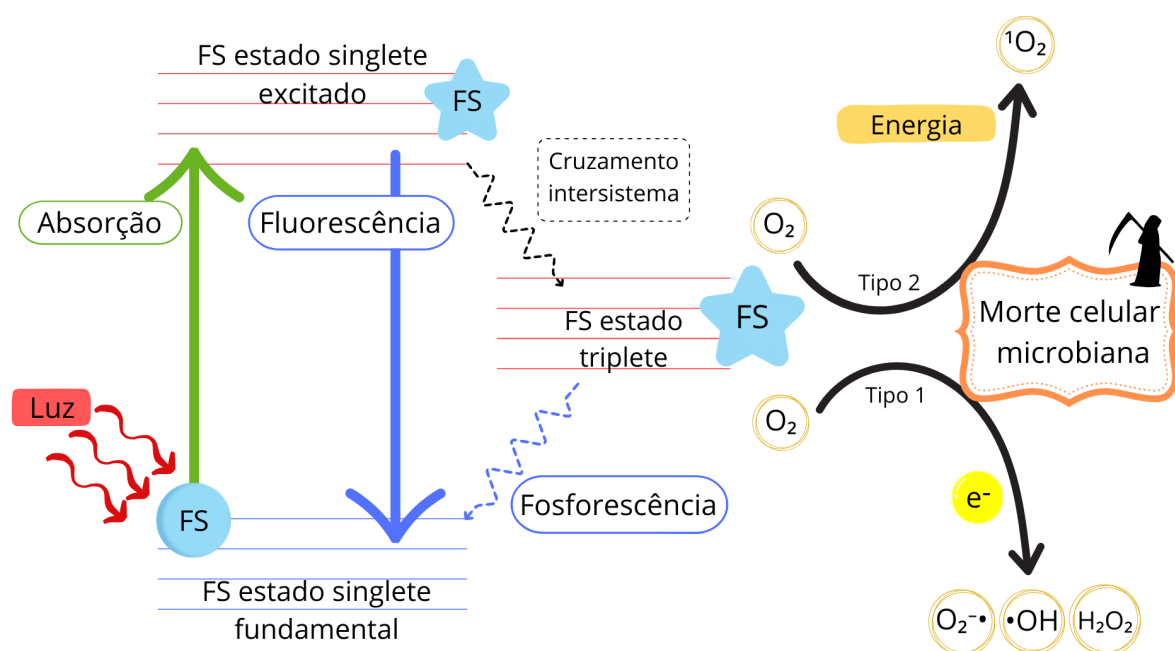


Figura 2 – Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica por meio do diagrama de Jablonski. O fotossensibilizador (FS) pode absorver um fóton, mudando do estado fundamental para o estado singlete excitado. Posteriormente, pode-se ocorrer um cruzamento intersistema para um estado tripleto, capaz de interagir com o oxigênio (O_2) e gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). No mecanismo do tipo 1, ocorre a transferência de elétrons (e^-) a partir do FS excitado, formando ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Enquanto no mecanismo do tipo 2, o FS em estado tripleto pode interagir diretamente por troca de energia com o O_2 no estado fundamental tripleto, levando à formação de oxigênio singleto (1O_2) excitado. As EROs geradas levam a morte celular microbiana, por meio de reações com paredes celulares, membranas lipídicas, peptídeos e ácidos nucleicos.

1.3.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, existem naturalmente na vida aeróbica eucariótica. Tal fato ocorre porque o metabolismo do oxigênio pelas mitocôndrias é crucial para a sobrevivência das células, mas também é fonte desses subprodutos danosos às macromoléculas (Fridovich, 2004). A homeostase é mantida por meio de agentes antioxidantes, capazes de competir com os substratos e inibir a oxidação. Estes agentes podem ser enzimáticos, como superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase, ou não enzimáticos, por exemplo, vitamina C, vitamina E, β -caroteno e glutatona (Dröge, 2002).

Quando o equilíbrio é perdido entre a quantidade de EROs e de agentes antioxidantes, a célula entra no estado de estresse oxidativo. Sem a desintoxicação, vários alvos moleculares ficam suscetíveis à oxidação pelas EROs, como aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos (Hamblin; Hasan, 2004). Por exemplo, a peroxidação lipídica se inicia com a

apropriação de um elétron de um lipídio da membrana celular pela ERO, iniciando uma reação em cadeia que prejudica toda a estrutura. Outrossim, algumas EROs são extremamente tóxicas e letais por não possuírem antioxidantes enzimáticos para combatê-las, como o radical hidroxila e o oxigênio singlete (Vatansever *et al.*, 2013).

O tipo e a extensão da morte celular na TFD estão intrinsecamente relacionados à produção de EROs e, conseqüentemente, ao FS utilizado. Primeiramente, a localização subcelular do FS influencia devido à maioria das EROs serem altamente reativas e não se espalharem. Outros pontos são a concentração do FS e as suas propriedades físico-químicas, que interferem no tipo de reação fotoquímica que produzirá mais EROs, tipo I ou II. Além disso, a concentração de oxigênio e as características da luz (comprimento de onda e intensidade) são dois elementos essenciais na capacidade destrutiva da TFD (Castano; Demidova; Hamblin, 2005).

1.3.3 Fotossensibilizador (FS)

Um FS é um complexo natural ou sintético capaz de absorver e transferir energia luminosa. Para aplicações biológicas, como a TFD, o FS precisa ter: boa estabilidade; retenção preferencial pelas células-alvo; excreção acelerada; toxicidade mínima no escuro; toxicidade na ativação da luz; bom rendimento de oxigênio singlete e alta taxa de extinção molecular (Horne; Cronjé, 2017).

A popularização da TFD, com o sucesso da porfirina, culminou na busca de novas moléculas que pudessem atuar como FS. Novas gerações de FS foram desenvolvidas e comercializadas, por exemplo, hipericina, rosa bengala, derivados do azul do Nilo e azul de metileno. Além disso, outros FSs foram aplicados na clínica, como clorina, BODIPY, tetrapirrol e ftalocianina. Dentre diversos macrociclos estudados, as ftalocianinas possuem grande potencial como FS, pois apresentam: forte absorção em comprimentos de onda de 650-800 nm (janela terapêutica); bom rendimento de oxigênio singlete; baixa toxicidade *in vitro* no escuro e rápida excreção pelo organismo (Gomer, 1991; Pham *et al.*, 2021).

1.3.3.1 Ftalocianina (Pc)

A ftalocianina (Pc) é uma estrutura feita de heterociclos aromáticos, núcleos benzênicos ligados por átomos de nitrogênio. Suas estruturas químicas podem ser modificadas por meio de mudanças do íon metálico central, o que ocasiona diferenças em suas propriedades fotofísicas. Alguns íons diamagnéticos permitem aos complexos de Pc um alto rendimento de tripleto com longos tempos de vida, como os íons de alumínio, de zinco e de silício. Por isso, alguns exemplos de derivados de Pc são hexadecafluorozinco Pc, hidróxi-alumínio Pc, silício Pc e cloreto de alumínio Pc (Li *et al.*, 2019).

Apesar de serem FSs com grande potencial, as Pcs apresentam dois principais de-

safios mediante suas estruturas químicas: a tendência de agregação e a baixa solubilidade em água. Em meios aquosos, fisiológicos, as Pcs tendem a se agregar, formando dímeros por meio de associação intermolecular pela hidrofobicidade. Todavia, somente monômeros de Pc possuem fotoatividade, ou seja, a agregação prejudica diretamente o rendimento de fluorescência; conseqüentemente, causa redução de eficácia de Pc como FS (Rossetti *et al.*, 2011; Rak *et al.*, 2019).

Esses desafios podem ser contornados por meio do uso da nanotecnologia. Esta é capaz de aumentar a atividade de Pc hidrofóbicas em meios aquosos, protegendo-as contra agregação e melhorando o tempo entre sua aplicação e a posterior irradiação. A nanotecnologia também possui potencial para aprimorar a estabilidade e a biodisponibilidade das Pcs, influenciando no transporte até as células-alvo, evitando acúmulos em outras células e diminuindo efeitos colaterais (Jia; Jia, 2012; Santos *et al.*, 2020).

1.3.3.2 Nanotecnologia na TFD

Por anos, a definição de nanotecnologia se baseou apenas em tamanho, pois se tratava de um produto de um campo de estudo que envolve a síntese, o processamento e a aplicação de materiais em nanoescala (10^{-9} m ou 1 nm). Embora o critério de tamanho, entre 1 a 100 nm, seja conveniente, ele não reflete a realidade científica da nanociência (Grieneisen; Zhang, 2011). Além de possuir uma de suas dimensões em nanoescala, uma nanotecnologia deve ter características físico-químicas derivadas desse pequeno tamanho combinado à sua composição e à sua estrutura química. Alterações nessas propriedades permitem versatilidade e aprimoramento no desenvolvimento de novos produtos, diversificando as aplicações da nanotecnologia (Ahmeda; Ahmida; Ahmeida, 2017).

Na TFD, essa tecnologia trouxe novos veículos de fotossensibilizantes. Estes sistemas visam transportar a substância no organismo de forma a alcançar o efeito terapêutico esperado. Por isso, a nanotecnologia trabalha tanto com direcionamento para o local-alvo quanto com a farmacocinética do sistema (Al-Hussin; Alsayed; Yousif, 2017). Entre as diversas plataformas nanotecnológicas de veículo, algumas têm sido aplicadas na TFD para transporte de FS, como micelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanocarreadores e nanoemulsões. Outrossim, também existem as que funcionam sendo o próprio FS, por exemplo, os *quantum dots* (Huang *et al.*, 2012).

1.3.3.3 Nanoemulsões (NE)

As emulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis com aspecto macroscópico homogêneo, cuja interface entre as fases é estabilizada por emulsificante. Geralmente, estas são do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). As NE, especificamente, têm gotículas de fase dispersa com o diâmetro médio entre 20 a 500 nm, com aparência normalmente translúcida ou transparente. Essas características são derivadas essencial-

mente da fase hidrofóbica e das moléculas anfífilas utilizadas, por exemplo, pequenas moléculas de emulsificantes tendem a gerar emulsões menores (Mason *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2017).

As NEs mostraram vantagens para aplicações na área da saúde, como viabilizar a solubilidade do fármaco de interesse, melhorando a biodisponibilidade. Também possuem boa estabilidade cinética, devido ao pequeno tamanho, permitindo uma maior funcionalização da molécula com aditivos. Outrossim, em comparação às emulsões convencionais, as NEs têm maior área interfacial, são absorvidas mais rapidamente e possuem boa permeação na derme. Tais questões têm atraído pesquisadores para o uso de NEs inclusive na TFD, reduzindo a agregação do FS e aumentando sua estabilidade (Moghassemi *et al.*, 2022).

1.3.4 Nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc)

O uso de NEs na TFD aprimora a aplicação do FS, pois minimiza alterações em suas propriedades físico-químicas em soluções aquosas. Isso é visto no derivado de Pc, cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc), em que, quando disperso em água, tem sua absorção de luz e sua fluorescência significativamente reduzidas, enquanto em NE há a absorção (674 nm) e a emissão de fluorescência (684 nm; excitação em 350 nm) equivalente à AlPc em etanol (Muehlmann *et al.*, 2015). Essa NE de AlPc foi desenvolvida na Universidade de Brasília (UnB), por meio do método de emulsificação espontânea.

Este método envolve a mistura à temperatura ambiente de dois líquidos, um sendo uma fase aquosa pura e o outro uma mistura de óleo, surfactante e solvente miscível em água (Anton; Vandamme, 2009). No caso desta NE, o AlPc foi dissolvido em etanol, posteriormente colocado na mistura de óleo de rícino e surfactante e aquecido para remoção do álcool antes da emulsificação (Muehlmann *et al.*, 2015). Ao se reproduzir obteve-se a NEAlPc na concentração final de 40 μM , com um diâmetro hidrodinâmico médio de $27,15 \pm 1,070$ nm, um potencial zeta de $-0,340 \pm 0,188$ mV e um índice de polidispersão de $0,178 \pm 0,026$ (Morais *et al.*, 2024).

A TFD mediada por esta NEAlPc é capaz de induzir respostas locais e sistêmicas do sistema imunológico contra melanoma em camundongos (Morais *et al.*, 2024) e é eficaz na redução da viabilidade de carcinoma espinocelular oral *in vitro* (Cangussu *et al.*, 2022). Para além da aplicação anticâncer, esta TFD também teve bons resultados contra formas parasitárias de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Pinto *et al.*, 2021) e contra linhagens de *Cryptococcus neoformans* e de *Cryptococcus gattii*, no último, gerando concentração inibitória mínima de 12,5 nM (Ranjan *et al.*, 2024).

1.3.5 Dispositivos de fonte de luz

Um parâmetro fundamental na TFD é a dose fotodinâmica, composta da quantidade de fótons absorvidos pelo FS por grama de tecido. Em geral, tal dose está intrinsecamente relacionada às características do FS e à luz, principalmente à taxa de fluência (W/cm^2) e ao tempo de irradiação. Outro conceito físico importante é a integral da taxa de fluência ao longo do tempo, conhecida apenas como fluência da luz, com unidade em J/cm^2 (Zhu; Finlay; Wilson, 2005; Algorri *et al.*, 2021). Além disso, a distribuição uniforme desta fluência dentro do alvo é o que proporciona a eficácia da TFD, dependendo de propriedades da luz. Por exemplo, quanto maior o comprimento de onda for, maior é a profundidade de penetração da luz em uma terapia de pele (Ash *et al.*, 2017).

Algumas fontes de luz populares na TFD são lâmpada, laser e diodo emissor de luz (LED). As lâmpadas foram as primeiras fontes artificiais usadas para TFD e possuem baixo custo financeiro, porém têm um espectro de banda larga (300–1200 nm de comprimento de onda) (Wilson; Patterson, 1986). Enquanto isso, os lasers são utilizados em TFDs superficiais e intersticiais, com luz monocromática (espectro de banda estreita), todavia tendem a ser grandes e requerem muita manutenção (Wilson, 2007). Por fim, os LEDs são pequenos, adaptáveis e de baixo custo em comparação aos lasers, no entanto, uma preocupação do uso deles é a baixa eficiência de conversão elétrica para óptica, gerando um efeito térmico (Kim; Darafsheh, 2020).

De maneira similar, faz-se necessário adaptar as fontes de luz em dispositivos que atendam geometrias complexas da anatomia humana, sendo mais flexíveis. Um exemplo é a pesquisa em fibras ópticas plásticas em estruturas têxteis, as quais podem ser controladas endoscopicamente para locais como ouvido, nariz, garganta, pulmões, trato gastrointestinal e trato urinário. Outra forma é por meio do uso de agulhas transcutâneas para aplicações mais profundas (Cochrane *et al.*, 2013).

1.3.6 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD)

Entre a diversidade de aplicações da TFD, os nichos mais conhecidos são o combate ao câncer e a micro-organismos. A aTFD teve início nos anos de 1900, coexistiu com o posterior desenvolvimento de antibióticos e cresceu significativamente após o estopim da resistência bacteriana. Outrossim, é considerada um tratamento seguro e também abrange outros organismos, como vírus, protozoários e fungos (Wainwright *et al.*, 2017).

O uso da aTFD para o controle de infecções principalmente em ambientes de assistência médica ocorre por causa de sua capacidade de inativação de linhagens multirresistentes. Por exemplo, dispositivos médicos compostos por materiais antimicrobianos viabilizam o combate a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e a *Escherichia coli*, por meio da incorporação de fotossensibilizadores em polietileno de alta densidade para

TFD (McCoy *et al.*, 2014). Além de aplicações em cateteres e em próteses permanentes, a aTFD possui potencial na desinfecção da água residual de hospital, que contém linhagens resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* (Almeida *et al.*, 2014).

Diferentemente dos agentes convencionais, a aTFD possibilita um ataque não específico às células microbianas, mediado pelo estresse oxidativo. Tal processo dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência comuns aos patógenos, como a inativação do fármaco e a alteração do sítio-alvo. Além disso, a estrutura de biofilme também é um fator prejudicado pela atividade de EROs, já que estas abarcam biomoléculas não celulares, como os polissacarídeos presentes na matriz extracelular (Wainwright; Crossley, 2004).

Embora as EROs ataquem a matriz extracelular, uma grande dificuldade é a penetração do FS em biofilmes maduros. Por isso, é necessário o aprimoramento de FSs, como os derivados de Pc, juntamente à nanotecnologia, potencializando as aplicações na área da saúde (Siqueira *et al.*, 2022). Isso inclui tratamentos de infecções fúngicas superficiais da pele e da membrana mucosa, como as causadas por biofilmes de *Candida albicans*, particularmente em pacientes imunocomprometidos (Gonzales; Maisch, 2012). Por conseguinte, a TFD é uma das alternativas que existem para se frear a resistência antimicrobiana.

2 Justificativa

Anualmente, estima-se que 1,5 milhão de pessoas no mundo tenham candidíase invasiva, com cerca de 60% de mortes (Denning, 2024). A principal espécie relacionada à esta infecção é a *Candida albicans*, frequentemente encontrada em associação com biofilmes, sendo protegida por matriz extracelular. Os biofilmes são um grande desafio para o tratamento da candidíase, uma vez que resistem aos antifúngicos e às respostas do sistema imune do paciente (Nett; Andes, 2020). Além disso, é necessária cautela ao administrar os medicamentos atuais, como anfotericina B, pois tendem a apresentar alta nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Gao *et al.*, 2024).

As limitações existentes para o tratamento de infecções causadas por *C. albicans* incentivam a busca de novas opções terapêuticas. A TFD mediada por NEAlPc possui atividade antimicrobiana conhecida, porém não foi testada contra biofilmes de *C. albicans*. Portanto, a avaliação contra biofilmes é essencial para validar essa terapia como potencial tratamento para candidíase.

2.1 Objetivos

2.1.1 Geral

Avaliar o efeito antibiofilme da TFD mediada por NEAlPc em modelos com *Candida albicans*.

2.1.2 Específicos

- Testar condições experimentais para a formação de biofilmes maduros de *C. albicans* *in vitro* em placas de 96 poços.
- Acompanhar o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* por meio de ensaio colorimétrico e microscopia óptica.
- Padronizar o protocolo de TFD para biofilmes de *C. albicans*.
- Avaliar a viabilidade dos biofilmes expostos à TFD e sua correlação com a concentração de NEAlPc aplicada.
- Comparar a eficácia da TFD mediada por NEAlPc com a de um antifúngico convencional (anfotericina B).

3 Método

Neste capítulo, para melhor compreensão e transparência, serão descritos em ordem: reagentes, materiais, equipamentos utilizados; os processos de padronização de protocolo, tanto para a formação dos biofilmes, quanto para a TFD; ensaios biológicos juntamente à TFD otimizada; ensaios de viabilidade. Todos os experimentos realizados nesta pesquisa foram feitos com a colaboração da Professora Doutora Ildinete Silva Pereira e a co-orientação da Professora Doutora Patrícia de Albuquerque de Andrade Nicola, no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos (LBMFP), situado no Departamento de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas (IB), *Campus* Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília (UnB).

3.1 Reagentes, materiais e equipamentos

As listas de reagentes, materiais e equipamentos utilizados neste estudo estão detalhadas nas tabelas 1, 2 e 3 a seguir:

Tabela 1 – Reagentes utilizados para realização dos experimentos.

Reagente	Fabricante
Ágar (<i>European Bacteriological Agar</i>)	<i>Kasvi</i>
Álcool Etílico	Dinâmica
Cloreto de potássio	<i>J.T.Baker</i>
Cloreto de sódio	Dinâmica
Fosfato dissódico	<i>Vetec</i>
Fosfato monopotássico	Dinâmica
Glicerina	<i>Vetec</i>
Hipoclorito de sódio	Oeste
MOPS <i>sodium salt</i>	<i>Sigma</i>
Resazurina (<i>AlamarBlue</i>)	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
RPMI 1640	<i>Gibco</i>
<i>Sabouraud Dextrose Broth Eur. Pharma./USP</i>	<i>Kasvi</i>
Soro fetal bovino	<i>Gibco</i>
XTT	<i>Molecular Probes</i>

3.2 Obtenção de biofilme de *Candida albicans* SC5314

Os experimentos *in vitro* foram desenvolvidos com a linhagem de *Candida albicans*– SC5314. Para tanto, os procedimentos que necessitavam de ambiente estéril foram realizados em fluxo laminar limpo com álcool 70% e com irradiação de luz ultravioleta

Tabela 2 – Materiais utilizados para realização dos experimentos.

Material	Fabricante
Alça de inoculação descartável	<i>FirstLab</i>
Filtro de 0,22 μm	<i>Corning</i>
Luva de nitrilo	<i>Medix</i>
Microtubo de centrifugação	<i>Olen</i>
<i>Parafilm</i>	<i>Kasvi</i>
Placa de 96 poços	<i>Corning</i>
Placa de 96 poços	<i>Kasvi</i>
Placa de Petri	<i>Deskarplás</i>
Ponteira para pipetas	<i>Olen, Perfecta, Sarstedt</i>
Tubo de centrifugação	<i>Perfecta</i>

Tabela 3 – Equipamentos utilizados para realização dos experimentos.

Equipamento	Modelo	Fabricante
Aagitador Magnético	K40-1810	<i>Kasvi</i>
Autoclave	AV-30Plus	<i>Phoenix Luterco</i>
Balança analítica	AY220	Marte
Banho-maria	Isotemp 205	<i>Fisher Scientific</i>
Bomba a vácuo	WP6111560	<i>Millipore</i>
Câmara de <i>Neubauer</i>	K5-0011	<i>Olen</i>
Centrífuga	<i>Heraeus Megafuge</i> 16R	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Espectrofotômetro	<i>Eon</i>	<i>Biotek</i>
Espectrofotômetro	<i>SpectraMAX 190</i>	<i>Molecular Devices</i>
Estufa 30°C	MA032	<i>Marconi</i>
Estufa 37°C	410T	<i>Ethik technology</i>
Fluxo laminar	Biosegl 09 Cl II Tipo A1	Biosegl VECO
Hemocitômetro	ION-1026	<i>Digitimer</i>
Incubadora <i>shaker</i>	CT-712	<i>Cientec</i>
Medidor de pH	<i>FiveEasy FP20</i>	<i>Mettler Toledo</i>
Microscópio de luz invertido	<i>Primovort</i>	<i>ZEISS</i>
Pipeta	<i>Labmate Pro</i>	HTL
Pipeta multicanal	<i>Labmate Pro</i>	HTL
Refrigerador	DFN41	<i>Electrolux</i>
Vórtex	SI-0246	<i>Scientific Industries</i>

(UV) por 15 minutos. Além disso, os materiais utilizados que continham micro-organismos eram selados com *parafilm* (filme plástico de parafina) e os descartes eram colocados em recipientes com hipoclorito de sódio (0,2%), posteriormente autoclavados.

3.2.1 Meios de cultura e tampão

O meio *Sabouraud* dextrose, amplamente utilizado para o cultivo de fungos, foi preparado tanto na forma sólida quanto líquida. Para ambas as preparações, 30 g de *Sabouraud dextrose broth Eur. Pharma./USP* foram dissolvidos em um litro de água destilada, com ajuste do pH para 5,6. Na preparação do meio sólido (*Sabouraud* dextrose ágar - SDA), foram adicionados 15 g de ágar (*European bacteriological agar*) à solução antes da esterilização. Após a autoclavagem, 12 mL do meio sólido foram distribuídos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, enquanto o meio líquido (*Sabouraud* dextrose) foi mantido sem a adição de ágar e permaneceu na forma líquida após a autoclavagem.

Outrossim, o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 foi usado durante os testes com biofilmes. O preparo deste meio foi realizado com o dobro da concentração indicada ($2\times$), de acordo com (Souza-Silva *et al.*, 2018), por meio da dissolução de 10,4 g de RPMI 1640 (com L-glutamina, 25 mM de HEPES e sem bicarbonato de sódio) e 330 mM de MOPS (3-[N-morpholino]propano sulfônico) em 500 mL de água destilada. Após o ajuste do pH para 7,0, o meio foi esterilizado por filtração com uma membrana de 0,22 μm com auxílio de uma bomba a vácuo, dentro do fluxo laminar em uma garrafa previamente autoclavada.

Além disso, a solução tampão fosfato (PBS) foi feita com base no mesmo artigo citado (Souza-Silva *et al.*, 2018), com 137 mM de NaCl (cloreto de sódio); 2,7 mM KCl (cloreto de potássio); 10 mM de Na_2HPO_4 (fosfato dissódico) e 2 mM de KH_2PO_4 (fosfato monopotássico). Depois do pH ser ajustado para 7,4, o tampão foi esterilizado por autoclavagem.

3.2.2 Manutenção celular

A linhagem celular *Candida albicans*– SC5314 utilizada foi preservada em criotubos contendo 50% de glicerol e 50% de meio *Sabouraud* Dextrose líquido, devidamente identificados e armazenados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. A cada semana, uma alíquota dessas suspensões foi estriada em placa de Petri com meio *Sabouraud* Dextrose Ágar (SDA) e mantida na estufa a $30\text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. Depois, a placa com novas colônias isoladas de fungo era guardada em refrigerador a $\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3 Padronização de tempo e de concentração de células

Primeiramente, foi feito o inóculo a partir de uma placa recém-semeada. Ou seja, uma colônia foi colocada com o auxílio de uma alça descartável em aproximadamente 5 mL de meio *Sabouraud* dextrose líquido dentro de um tubo de centrifugação de 50 mL. Depois, o tubo foi mantido em uma incubadora *shaker* a $30\text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm, por 24 h.

No dia seguinte, foi realizado o plaqueamento das células em duas placas de 96 poços, uma para a formação de biofilme em 24 h e outra em 48 h. Deste modo, o tubo de centrifugação de 50 mL foi retirado da incubadora *shaker* (Figura 3A) e submetido à centrifugação a $1200 \times g$ (Figura 3B). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de PBS (Figura 3C), essa lavagem foi repetida por três vezes (Figura 3D). Na última ressuspensão, foram colocados 5 mL de meio RPMI 1640 no tubo. Para se realizar a contagem de células desta suspensão-mãe, foi utilizada a Câmara de *Neubauer* juntamente com a seguinte fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{de células contadas}}{n^{\circ} \text{de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Desta maneira, com o conhecimento da concentração da solução-mãe, foi usada a seguinte equação para determinar o volume necessário para o estabelecimento do biofilme:

$$\text{concentração inicial} \times \text{volume inicial} = \text{concentração final} \times \text{volume final}$$

Com isso, foi feito um estoque com as concentrações $1,0 \times 10^6$ células/mL e de $1,0 \times 10^7$ células/mL. Após o preparo, foram colocados 100 μL destes estoques em cada poço a ser analisado, em placas de 96 poços da *Kasvi*. Depois, as placas eram mantidas em câmara úmida na estufa de 37°C , uma por 24 h e outra por 48 h.

Os biofilmes formados foram lavados com PBS estéril duas vezes, com auxílio da pipeta multicanal. Este processo consistiu em retirar o meio RPMI 1640, descartá-lo e substituí-lo por 100 μL de PBS. Posteriormente, este PBS foi retirado, descartado e substituído por outros 100 μL de PBS. Após o descarte da segunda pipetagem de PBS, os biofilmes receberam novamente 100 μL de PBS estéril, que foram mantidos para os próximos passos.

Este procedimento de lavagem dos fungos foi realizado com extrema cautela. Cada pipetagem foi feita na parede do poço da placa de 96 poços, evitando o contato da ponteira com o biofilme. Essa ação foi feita vagarosamente, de forma gradual e controlada, demorando-se cerca de 10 segundos contados a cada movimentação de líquido (retirar ou colocar).

Posteriormente à lavagem, a estrutura dos biofilmes de *C. albicans* foi conferida e fotografada no microscópio invertido (*Primovert Zeiss*) com *AxioCam*. Esse passo visou garantir que a película de células com matriz extracelular estivesse bem formada, sendo descartados os experimentos que não a apresentassem.

Após essa análise, foram realizados testes de viabilidade. As diferentes condições dos biofilmes foram expostas a um controle de crescimento fúngico (NT) e a um con-

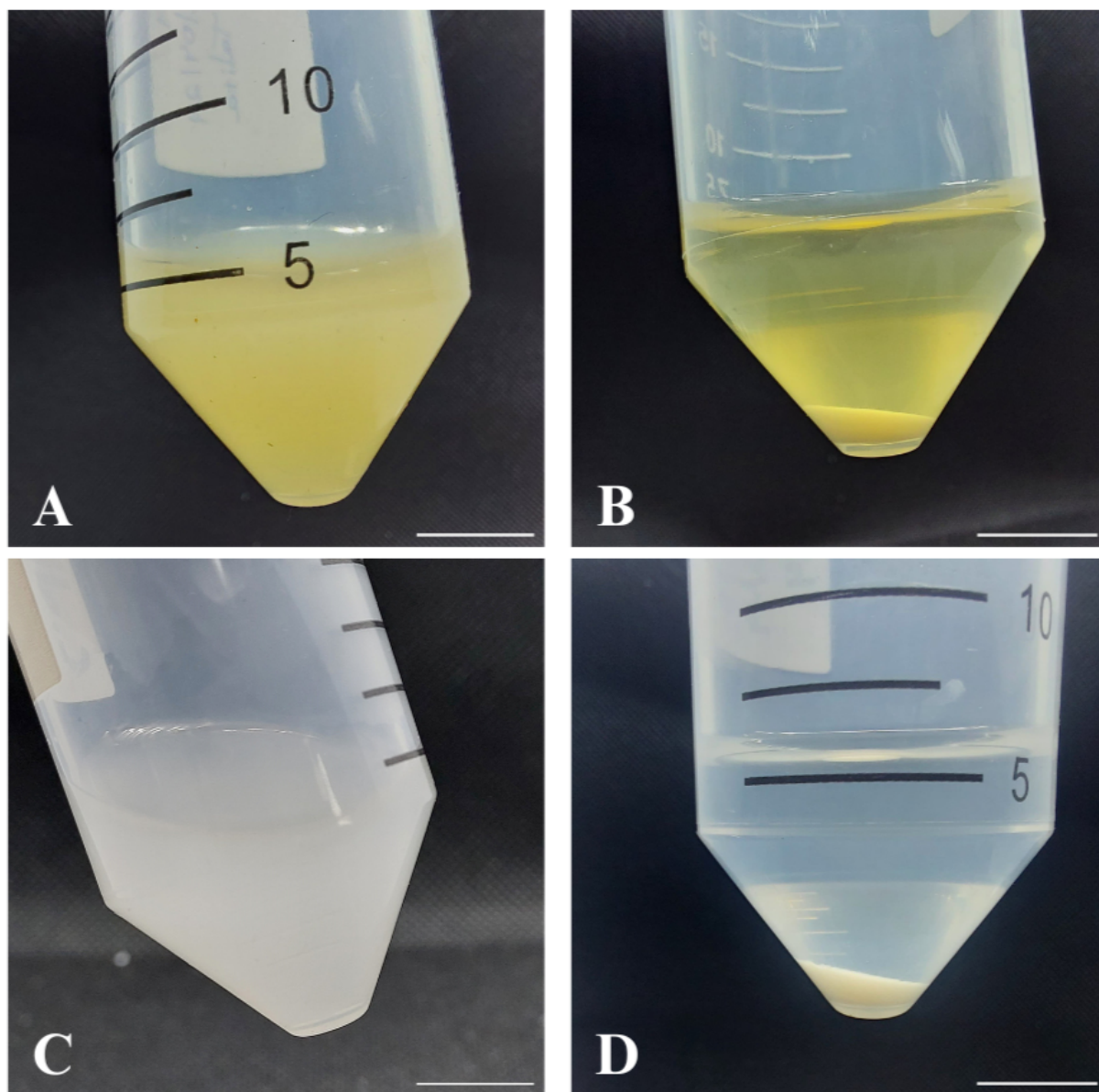


Figura 3 – Lavagem do inóculo de *Candida albicans* SC5314 em meio *Sabouraud* dextrose. Em A, o inóculo após 24 h na incubadora *shaker* a 30 °C. Em B, o *pellet* de células no fundo do tubo após a primeira centrifugação a $1200 \times g$. Em C, a ressuspensão do *pellet* em 5 mL de PBS. Em D, o *pellet* antes da ressuspensão em RPMI 1640. Barra de escala branca no canto inferior direito representa 1 cm.

trole de atividade antifúngica (anfotericina B, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada controle foi testado em quadruplicata nas seguintes condições estudadas:

- Biofilme de 24 h a partir de $1,0 \times 10^6$ células/mL
- Biofilme de 24 h a partir de $1,0 \times 10^7$ células/mL
- Biofilme de 48 h a partir de $1,0 \times 10^6$ células/mL
- Biofilme de 48 h a partir de $1,0 \times 10^7$ células/mL

Ambos os controles foram previamente diluídos em microtubos de centrifugação de 2 mL identificados com as siglas NT (controle de crescimento fúngico) e AnB (anfotericina B), respectivamente. O controle de crescimento fúngico (NT) foi feito pela diluição de 500 μL de meio RPMI 1640 2 $\times$ em 500 μL de PBS estéril. Enquanto o controle de atividade antifúngica (AnB) foi obtido por meio da diluição de 500 μL de anfotericina B de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 500 μL de meio RPMI 1640 2 $\times$.

Por conseguinte, os 100 μL de PBS foram substituídos por 100 μL dos controles em cada poço, seguindo este desenho experimental. Em seguida, as placas foram seladas e deixadas na estufa de 37 °C, em câmara úmida, por 24 h. Após o prazo, foram duas vezes lavadas com PBS, como descrito anteriormente, e preparadas para o teste colorimétrico XTT (sal de tetrazólio).

Para a avaliação de viabilidade celular com XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida), foram preparados, para cada placa, 12 mL de solução de XTT em PBS a uma concentração de 0,5 mg/mL. Depois do preparo, foi adicionada menadiona com a concentração final de 1 μM nesta solução. Assim, o PBS foi retirado das placas e 100 μL da solução XTT-menadiona foram colocados em cada poço a ser analisado, conforme descrito previamente ([Ramage *et al.*, 2001](#)). As placas voltaram à estufa de 37 °C, em câmara úmida, por duas horas. Ao fim do prazo, as placas foram colocadas no espectrofotômetro *Eon* e a absorbância foi medida ao configurar a leitura em 490 nm.

3.2.4 Padronização do biofilme mediante à exposição ao soro fetal bovino e padronização da avaliação de viabilidade pelo método da resazurina

Esta segunda otimização foi desenvolvida bem semelhante à primeira detalhada na seção anterior ([3.2.3](#)). Entretanto, foram testadas: a exposição prévia da placa de 96 poços ao soro fetal bovino (SFB) inativado e a avaliação colorimétrica pelo método da resazurina.

Para isto, no mesmo dia em que foi feito o inóculo (descrito anteriormente), também foi realizada a exposição em quadruplicata de 100 μL de SFB inativado em cada poço. A placa foi selada e mantida na estufa de 37 °C, em câmara úmida, por 24 h. Após o tempo estipulado, o inóculo foi submetido aos passos detalhados na seção 3.2.3, porém somente um estoque foi preparado na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL. Posteriormente, a placa de 96 poços previamente exposta teve o SFB removido e substituído por 100 μL do estoque. Também foram pipetados 100 μL de suspensão de células em poços que não foram expostos ao SFB. Ao final, a placa foi deixada na estufa de 37 °C por 24 h, em câmara úmida.

Em seguida, a lavagem, a análise em microscópio e as diluições e aplicações dos controles para os testes de viabilidade seguiram como explicado na seção 3.2.3. Com exceção que as condições analisadas foram:

- Biofilme exposto ao SFB analisado por XTT
- Biofilme sem soro analisado por XTT
- Biofilme exposto ao SFB analisado por resazurina
- Biofilme sem soro analisado por resazurina

Após a lavagem da placa, a preparação do XTT foi de acordo com o descrito no final da seção anterior (3.2.3), todavia foram preparados 2 mL de solução XTT-menadiona. Ao passo que a resazurina estava em alíquota de 10 $\times$ para uso, logo foi preciso diluí-la dez vezes em PBS, em um microtubo de centrifugação de 2 mL. Deste modo, o PBS foi retirado e foram pipetados 100 μL de cada uma das soluções preparadas, seguindo as condições estabelecidas.

Os biofilmes retornaram à estufa de 37 °C, em câmara úmida, por duas horas. Depois deste tempo, a absorbância dos poços foi medida no espectrofotômetro *Eon*, com leitura configurada para comprimento de onda de 490 nm. Por fim, a fluorescência foi medida no *SpectraMax* com comprimentos de onda de excitação a 555 nm e de emissão a 585 nm.

3.3 Padronização da TFD

Após as otimizações para obtenção de biofilme, foram necessários experimentos para estabelecer o melhor protocolo de TFD a ser analisado o efeito da nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc) nos biofilmes de *Candida albicans*.

3.3.1 Padronização da concentração de anfotericina B

Para esta otimização, o biofilme foi formado em poços previamente expostos ao SFB inativado, com o plaqueamento de células feito a partir de um estoque com concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL e a placa foi mantida por 24 h na estufa de 37 °C. Logo, foram repetidas da seção 3.2.4 as etapas de: inóculo, exposição da placa ao SFB, contagem, plaqueamento, primeira lavagem dos biofilmes e análise em microscópio.

No entanto, os biofilmes lavados foram expostos a diferentes concentrações de anfotericina B por 30 minutos. As condições foram: um controle de crescimento fúngico (NT); anfotericina B a 2 µg/mL e anfotericina B a 4 µg/mL. Estas soluções foram preparadas ajustando os parâmetros descritos na parte de "diluição de controles" na seção 3.2.3. Após o período de 30 minutos, foram realizadas as etapas de lavagem, diluição da resazurina, exposição à resazurina e leitura da fluorescência conforme detalhado no fim da seção 3.2.4.

3.3.2 Padronização de biofilmes em microplaca de 96 poços

A condição analisada neste experimento foi a formação do biofilme em placa de 96 poços da *Corning*, ao invés da placa da *Kasvi*. Por isso, foram reproduzidas novamente da seção 3.2.4 as etapas de: inóculo, exposição da placa ao SFB, contagem, plaqueamento, primeira lavagem dos biofilmes e análise no microscópio. Para a TFD, esta otimização seguiu os mesmos passos detalhados na seção 3.4: diluição da NEAlPc e dos controles, exposição, lavagem, irradiação com LED 660 nm e teste de viabilidade pela resazurina.

3.4 Experimentos biológicos com biofilme previamente padronizado

Os ensaios padronizados estão divididos entre a formação do biofilme otimizado e a exposição à nanoemulsão AlPc com terapia fotodinâmica também otimizada. As etapas seguiram as recomendações de biossegurança detalhadas anteriormente (seção 3.2). Devido às otimizações descritas previamente, muitos passos desta seção já foram detalhados, então estão apenas citados junto a algum possível ajuste. Outrossim, os experimentos foram desenvolvidos conforme uma distribuição específica nas placas (Figuras 4A e 4B), seguindo um padrão quadrangular de 6×6 poços com exclusão das quatro pontas.

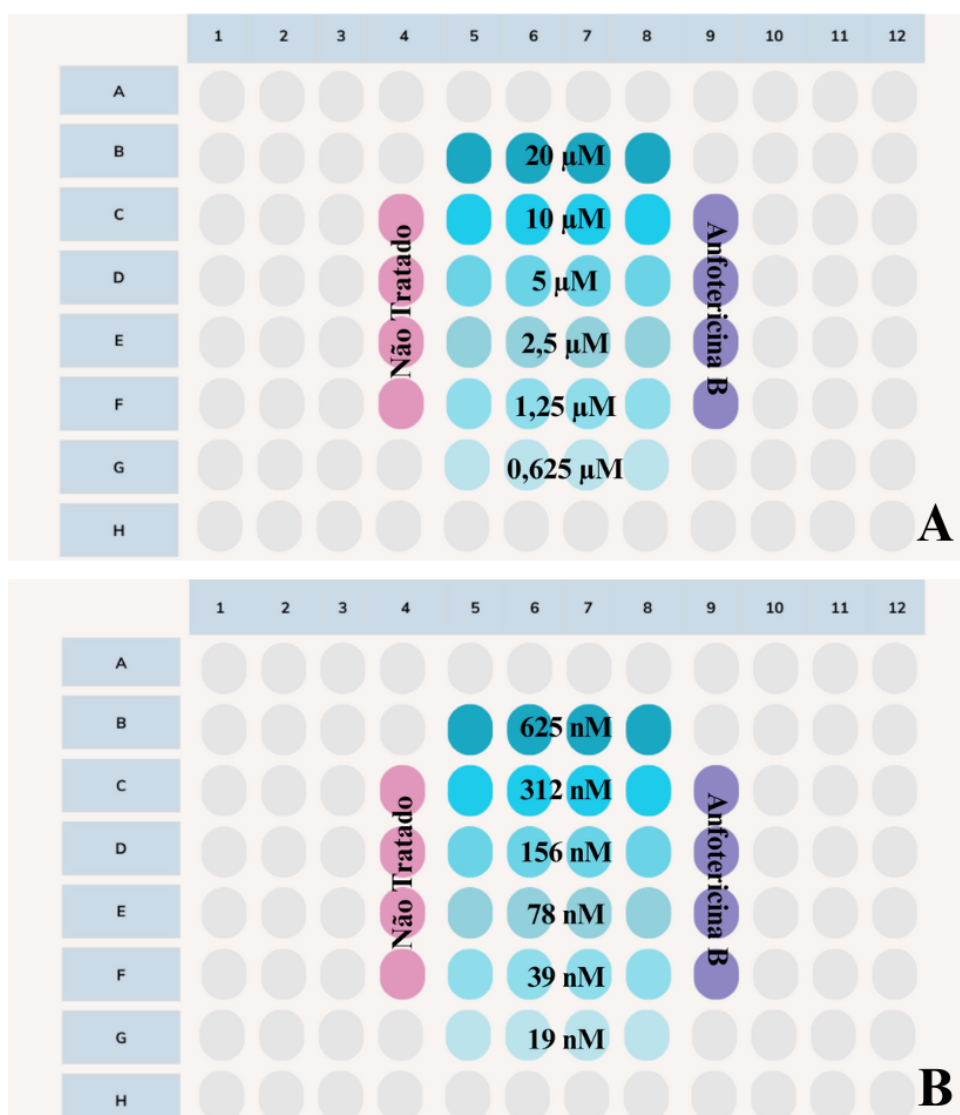


Figura 4 – Distribuição das condições testadas em biofilmes otimizados na placa de 96 poços em quadruplicata. Em A, o desenho da placa testando os controles de crescimento fúngico (NT), de atividade antifúngica (anfotericina B) e as concentrações de nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc): 20000 nM (20 μ M), 10000 nM (10 μ M), 5000 nM (5 μ M), 2500 nM (2,5 μ M), 1250 nM (1,25 μ M) e 625 nM (0,625 μ M). Em B, o desenho da placa testando os mesmos controles e as concentrações menores de NEAlPc: 625 nM, 312 nM, 156 nM, 78 nM, 39 nM e 19 nM. Observa-se o padrão quadrangular de 6 $\times$ 6 poços com exclusão das quatro pontas.

3.4.1 Estabelecimento do biofilme

Após as otimizações de protocolo, toda formação de biofilme de *Candida albicans* foi feita a partir de colônias isoladas de placas de Petri mais recentemente semeadas, como exemplificada na Figura 5. Desta forma, primeiramente, foi feito o inóculo e a exposição das placas de 96 poços da marca *Kasvi* ao soro fetal bovino (Figura 6A e 6B), seguindo a seção 3.2.4.

No dia seguinte, conforme descrito em "Padronização de tempo e de concentração de células" (3.2.3). O inóculo foi submetido à centrifugação, lavado três vezes com PBS e, por fim, ressuspenso em meio RPMI 1640. De acordo com o detalhado nesta mesma seção, foram feitos:

- a contagem de células em Câmara de *Neubauer*;
- o preparo de solução a $1,0 \times 10^6$ células por mililitro (células/mL);
- o plaqueamento em cada poço a ser analisado de 100 μ L deste estoque;
- a armazenagem das placas em câmara úmida na estufa de 37 °C por 24 h;
- a lavagem dos biofilmes de maneira cuidadosa (Figura 7C e 7D);
- a análise em microscópio invertido, procurando possíveis sinais de contaminação bacteriana que acarretaria em interrupção do experimento.

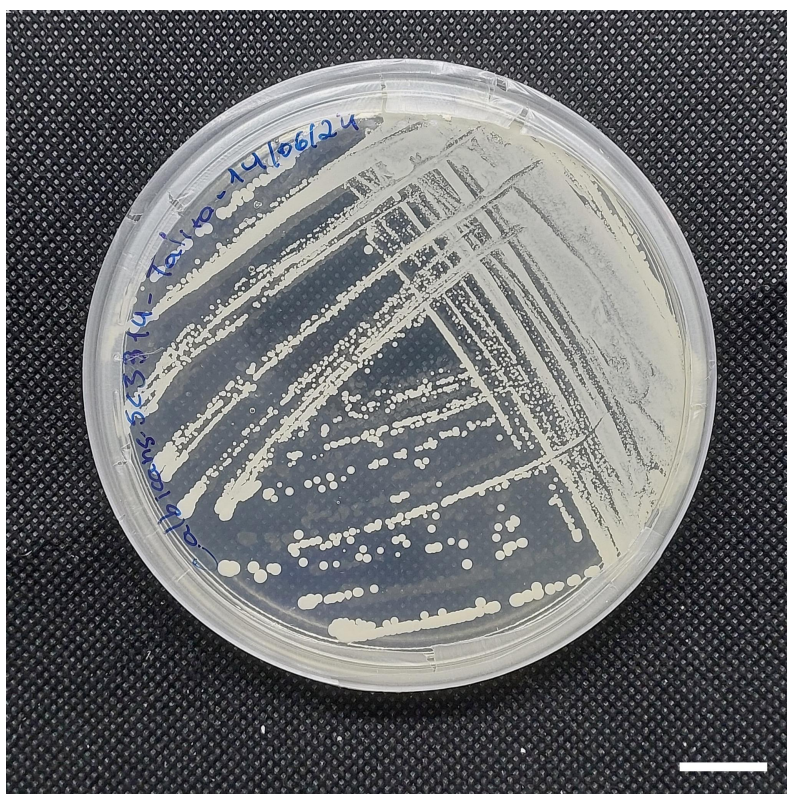


Figura 5 – Semeadura de *Candida albicans* SC5314 em placa de Petri com meio *Sabouraud* dextrose ágar (SDA). Barra de escala branca no canto inferior direito representa 1 cm.

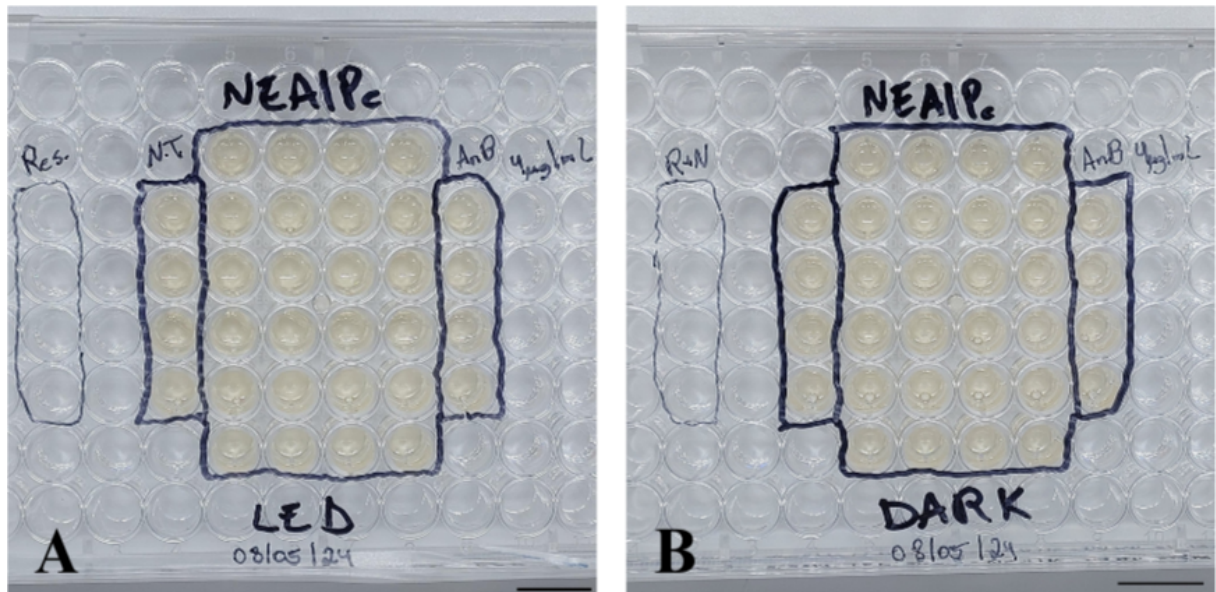


Figura 6 – Placas de 96 poços identificadas contendo soro fetal bovino (SFB). Em A, imagem de uma placa "LED" e, em B, imagem de uma placa "DARK". Observa-se o desenho das quadruplicatas e os poços reservados à solução de resazurina. A barra de escala preta, localizada no canto inferior direito, representa 1 cm.

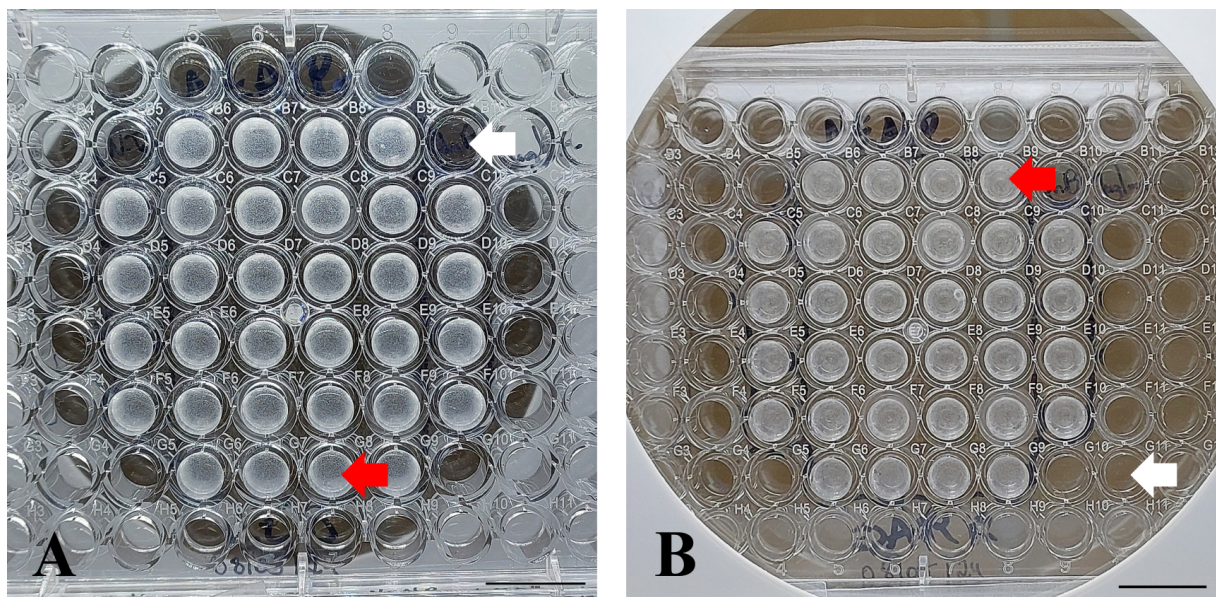


Figura 7 – Placas de 96 poços contendo biofilmes de *Candida albicans* SC5314 após lavagem. Em A, imagem de uma placa "LED" fotografada com fundo escuro. Em B, imagem de uma placa "DARK" fotografada sem contraste com fundo escuro. Setas brancas indicam poços sem biofilme, enquanto setas vermelhas indicam poços com biofilme. A barra de escala preta, localizada no canto inferior direito, representa 1 cm.

3.4.2 Protocolo de terapia fotodinâmica (TFD)

Posteriormente à formação e à análise dos biofilmes, foi feita a preparação para a TFD otimizada, em ambientes de baixa luminosidade. A terapia foi realizada para testar

as seguintes condições:

- Diferentes concentrações de NEAlPc irradiadas com LED
- Controle de crescimento fúngico (não tratado) irradiado com LED
- Controle de atividade antifúngica (anfotericina B) irradiado com LED
- Diferentes concentrações de NEAlPc no escuro
- Controle de crescimento fúngico (não tratado) no escuro
- Controle de atividade antifúngica (anfotericina B) no escuro

Inicialmente, foram avaliadas as concentrações de NE de: 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM e 0,625 μM . Tais quais foram diluídas, seriadamente, em meio RPMI 1640 duas vezes mais concentrado ($2\times$) em microtubos de centrifugação de 2 mL previamente identificados. Tal fato permitiu gerar 1 mL de cada concentração de NEAlPc a ser analisada entre 20 μM a 0,625 μM . Portanto, a diluição seriada foi feita com os seguintes passos:

- Identificação de microtubos de centrifugação de acordo com a concentração de NEAlPc.
- Pipetagem de 1 mL de meio RPMI $2\times$ em cada microtubo.
- Pipetagem de 1 mL da solução estoque de NEAlPc de 40 μM (Figura 8) no microtubo identificado como 20 μM .
- Homogeneização da mistura em vórtex por alguns segundos, para não criar bolhas.
- Pipetagem de 1 mL da NEAlPc de 20 μM no microtubo identificado como 10 μM .
- Homogeneização da mistura em vórtex por alguns segundos, para não criar bolhas.
- Repetição do processo até a concentração desejada de NEAlPc no experimento proposto (0,625 μM).

Todavia, foram feitas outras triplicatas que analisaram os efeitos de concentrações menores de NEAlPc (625 nM, 312 nM, 156 nM, 78 nM, 39 nM e 19 nM). Desta maneira, foi feito um estoque de 1250 nM a partir de outras duas diluições prévias do estoque de 40000 nM (40 μM). Primeiramente, a solução de 40000 nM foi diluída em água *Milli-Q* estéril para 5000 nM e, esta última foi diluída para 1250 nM. Dito isso, a diluição seriada para o experimento seguiu a lógica descrita antes, apenas mudando o começo:

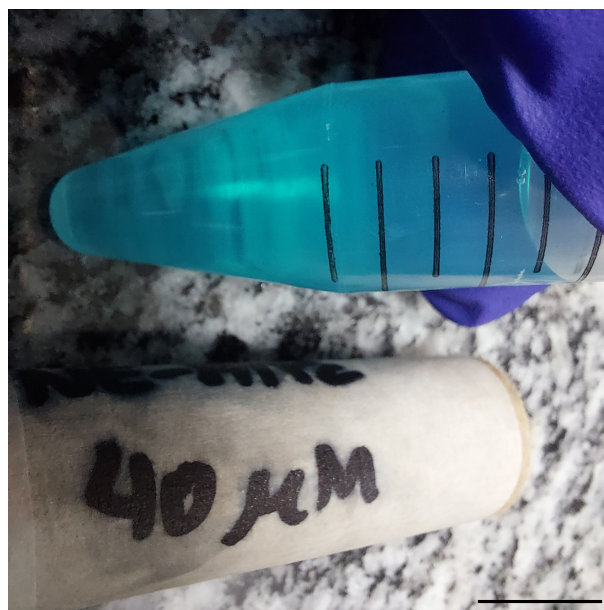


Figura 8 – Estoque da nanoemulsão AlPc na concentração de 40 μM . Barra de escala preta representa 1 cm.

- Identificação de microtubos de centrifugação de acordo com a concentração de NE-AlPc.
- Pipetagem de 1 mL de meio RPMI 2 $\times$ em cada microtubo.
- Pipetagem de 1 mL da solução estoque de NEAlPc de 1250 nM no microtubo identificado como 625 nM.
- Homogeneização da mistura em vórtex por alguns segundos, para não criar bolhas.
- Pipetagem de 1 mL da NEAlPc de 625 nM no microtubo identificado como 312 nM.
- Homogeneização da mistura em vórtex por alguns segundos, para não criar bolhas.
- Repetição do processo até a concentração desejada de NEAlPc no experimento proposto (19 nM).

Além disso, a preparação dos controles foi baseada nas diluições relatadas na seção 3.2.3, com exceção do controle de atividade antifúngica (anfotericina B). A concentração testada de anfotericina B (AnB) foi de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, logo diluíram-se 500 μL de anfotericina B de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 500 μL de meio RPMI 1640 2 $\times$. Assim, para a exposição à NEAlPc e aos controles, os 100 μL de PBS que estavam nos poços foram retirados e substituídos por 100 μL de cada concentração a ser analisada em quadruplicata. Em seguida, as placas foram cobertas por papel alumínio e mantidas em câmara úmida na estufa de 37 °C por 30 minutos.

Após os 30 minutos, houve a lavagem das placas (descrita em 3.2.3) e, subsequentemente, a inativação fotodinâmica pela irradiação da luz LED 660 nm. A placa controle *DARK* foi colocada coberta de papel de alumínio na estufa de 37°C. Enquanto isso, os biofilmes da placa "LED" foram irradiados com o LED 660 nm (Figura 9) desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza e seu aluno de mestrado André de Lima Silva Mariano, no Laboratório de Instrumentação e Software do Instituto de Física (IF) da UnB. Tal procedimento seguiu os parâmetros: irradiância de 60 mW/cm² e fluência de 108 J/cm² (Nunes, 2023). Os quais corresponderam a 50% da potência do LED, a uma duração de 30 minutos e à distância de 9 cm entre o LED 660 nm e a placa irradiada (Figura 10).

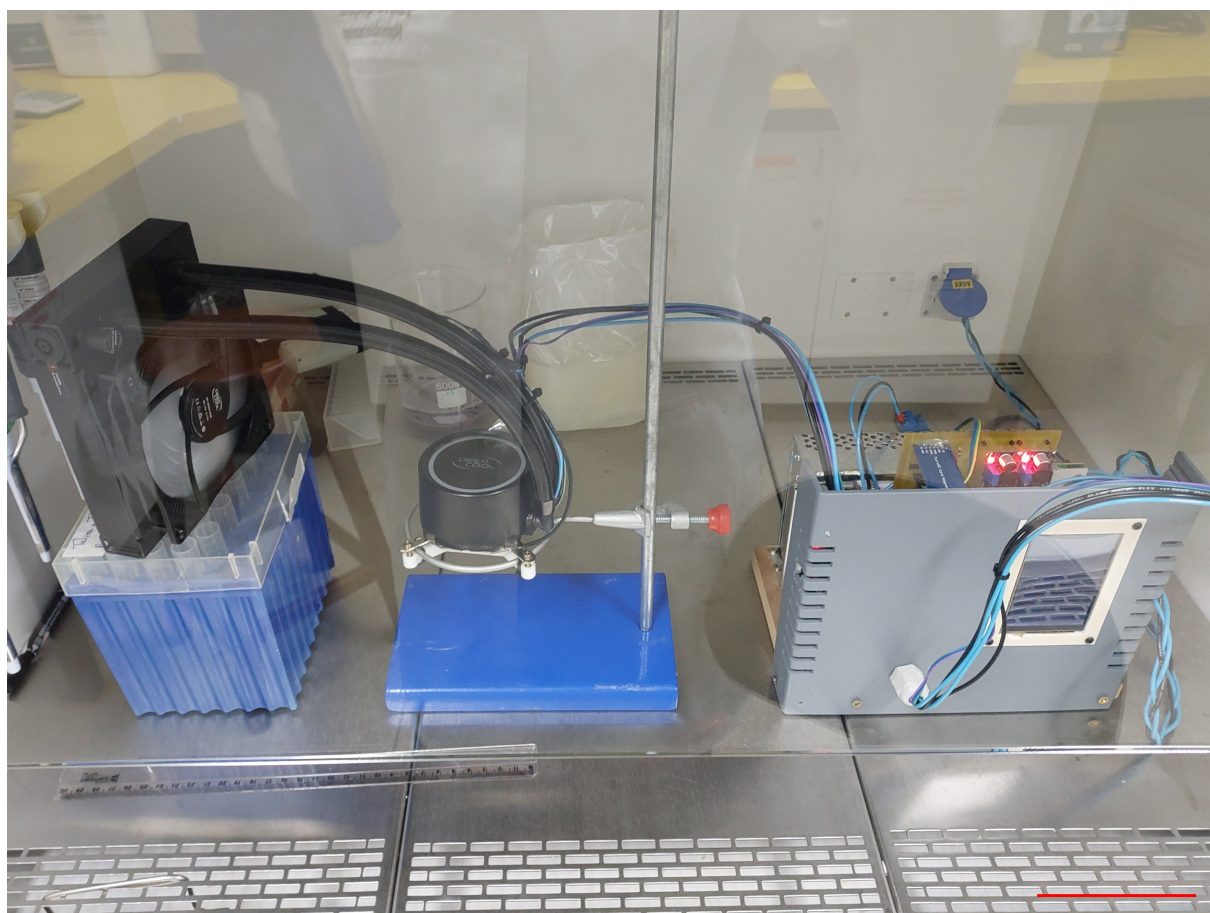


Figura 9 – Equipamento LED de 660 nm criado no Laboratório de Instrumentação e Software do Instituto de Física da Universidade de Brasília. O dispositivo está montado dentro de um fluxo laminar ligado previamente esterilizado. Barra de escala vermelha no canto inferior direito representa 10 cm.

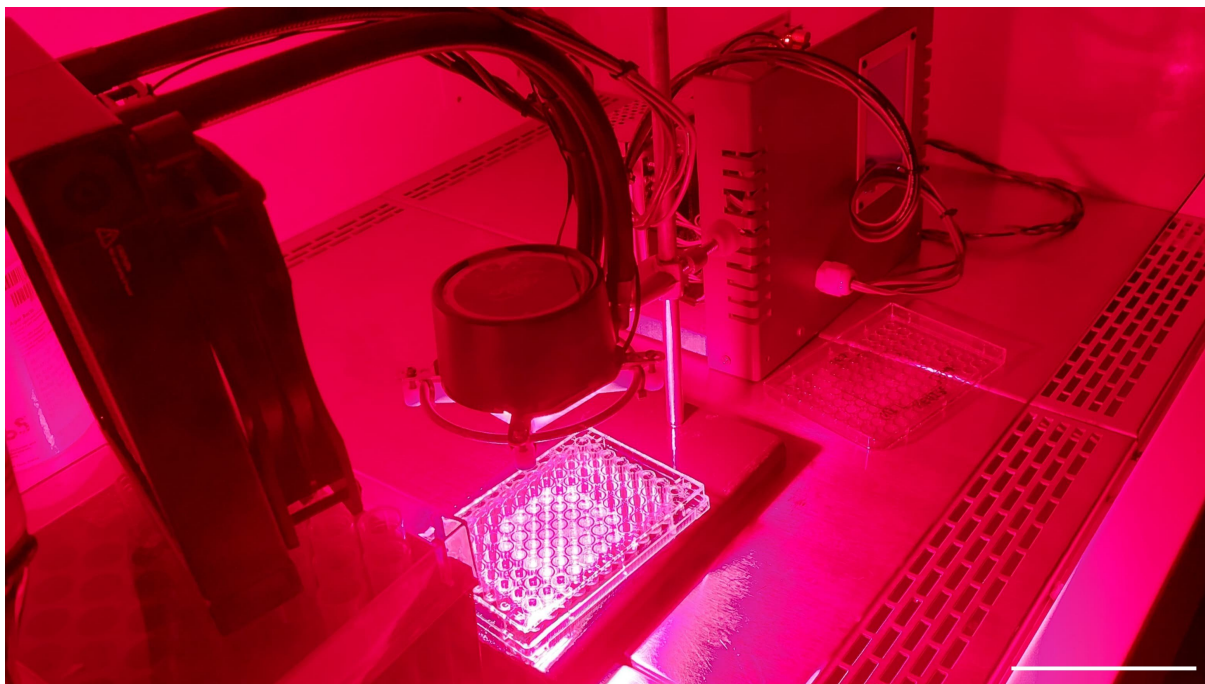


Figura 10 – Inativação fotodinâmica pela irradiação da luz LED 660 nm em uma placa "LED". O dispositivo está montado dentro de um fluxo laminar ligado previamente esterilizado. Barra de escala branca no canto inferior direito representa 10 cm.

3.5 Ensaios de viabilidade celular

Estes ensaios foram realizados de modo a avaliar o efeito da TFD com NEAIPc sob os biofilmes de *C. albicans*.

3.5.1 Método colorimétrico da resazurina

Após a otimização, os testes de viabilidade celular foram feitos utilizando a avaliação por método colorimétrico da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido), *Alamar-Blue*, de acordo com protocolo prévio (Dias *et al.*, 2024). Tal ensaio foi detalhado na seção 3.2.4. As placas LED e *DARK* tiveram o PBS retirado e foram expostas à solução de resazurina, 100 μ L por poço, e incubadas a 37 °C, por duas horas. Outrossim, foi feito um controle de apenas resazurina, em quadruplicata. No fim, a fluorescência dos poços foi medida utilizando o leitor de microplacas *SpectraMax* com modo de leitura de fluorescência. As condições de leitura foram configuradas com comprimentos de onda de excitação a 555 nm e de emissão a 585 nm. A leitura foi realizada no modo *endpoint*, coletando dados brutos em leitura manual.

3.5.2 Contagem de unidades formadoras de colônia

Posteriormente ao protocolo de TFD, os biofilmes em PBS foram desfeitos mecanicamente. Este passo consistiu em raspagem das células do fundo dos poços e fluxo de líquido, com o auxílio de uma pipeta de 200 μL . Depois, biofilmes de um poço de cada condição testada foram transferidos para microtubos de centrifugação previamente identificados. Para maior ruptura da estrutura do biofilme, os microtubos foram submetidos a uma homogeneização vigorosa em vórtex.

Outrossim, foram feitos dois grupos com diluições distintas em PBS:

- Diluições de 1:10, 1:100 e 1:200 para as condições na placa "*DARK*" com exceção do controle de atividade antifúngica (AnB) e para o controle de crescimento fúngico (NT) da placa "*LED*".
- Diluições de 1:1, 1:10 e 1:100 para as condições na placa "*LED*" com exceção do controle de crescimento fúngico (NT) e para o controle de atividade antifúngica (AnB) da placa "*DARK*".

Após ruptura, homogeneização e diluição dos biofilmes, cada condição testada foi plaqueada em placas de Petri tripartidas, contendo meio SDA, previamente identificadas. Foram transferidos 20 μL de cada uma das três diluições em cada espaço da placa tripartida. Posteriormente, o líquido foi espalhado com auxílio de pérolas de vidro estéreis, as quais foram removidas subsequentemente. Essas placas foram seladas e mantidas na estufa de 30 °C por 24 h. Por fim, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi feita com hemocitômetro.

3.6 Análise de dados

Todos os ensaios de padronizações foram realizados em apenas uma ocasião em quadruplicata técnica, enquanto os testes biológicos foram feitos em quadruplicata técnica em três experimentos independentes, no caso do método da resazurina, e em duplicata, em relação à contagem de UFC. Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de *Tukey-Kramer* para comparações múltiplas. Considerou-se um valor de $p < 0,05$ como significativo. As análises foram realizadas utilizando *Google Sheets* e *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software*). Outrossim, resultados qualitativos foram avaliados no teste de viabilidade da resazurina, devido à mudança de coloração observada entre os controles e as condições investigadas.

4 Resultados e Discussão

Este capítulo, para melhor organização, está dividido em: otimizações gerais, tanto de biofilme, quanto de protocolo para terapia fotodinâmica (TFD); e ensaios de viabilidade dos biofilmes após TFD mediada por nanoemulsão de cloreto de alumínio ftalocianina (NEAlPc).

4.1 Padronizações

Com o objetivo de estabelecer o melhor protocolo para desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*, foi realizada uma série de refinamentos antes dos ensaios biológicos da TFD mediada por NEAlPc. Estes resultados de otimização estão detalhados abaixo, mas, em resumo, foi selecionado o biofilme de 24 horas a partir da concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL, formado em poços previamente expostos a soro fetal bovino (SFB). Além disso, a concentração de anfotericina B escolhida como controle de atividade antifúngica foi a de $4 \mu\text{g/mL}$ e o teste de viabilidade escolhido foi o método colorimétrico da resazurina.

4.1.1 Formação de biofilme

Um biofilme de *C. albicans* possui os seguintes estágios sequenciais para sua formação: adesão das leveduras ao substrato; proliferação celular; maturação com presença de pseudo-hifas, de hifas e com produção da matriz extracelular; e dispersão de leveduras para novas colonizações (Rakhmatulina; Lipova; Nyanenko, 2024). Desta maneira, a técnica de formação de biofilmes equivalentes no fundo dos poços de placas de microtitulação de 96 poços passou a ser a mais usada em pesquisas com fungos, juntamente com a detecção de atividade metabólica de células presentes neles, por meio de leitura colorimétrica (Pierce *et al.*, 2010; Wall *et al.*, 2019).

Durante o estabelecimento de um biofilme, na fase intermediária (12 h a 30 h), inicia-se o processo de maturação com a produção de matriz extracelular e, posteriormente (38 h a 72 h), essa matriz fica tão densa que envolve todo o material celular (Chandra *et al.*, 2001). Uma vez que diferentes condições de crescimento interferem nas características estruturais a serem formadas (Mathé; Dijck, 2013), os primeiros experimentos de otimização (subseção 3.2.3) visaram estabelecer um tempo de formação (24 h ou 48 h) e uma concentração inicial de células ($1,0 \times 10^6$ células/mL ou $1,0 \times 10^7$ células/mL).

Em uma análise minuciosa durante a observação no microscópio invertido, foi possível constatar a presença tanto de blastosporos quanto de pseudo-hifas e hifas associadas a uma matriz. Tal fato ratificou que o biofilme de 24 h, com matriz extracelular e di-

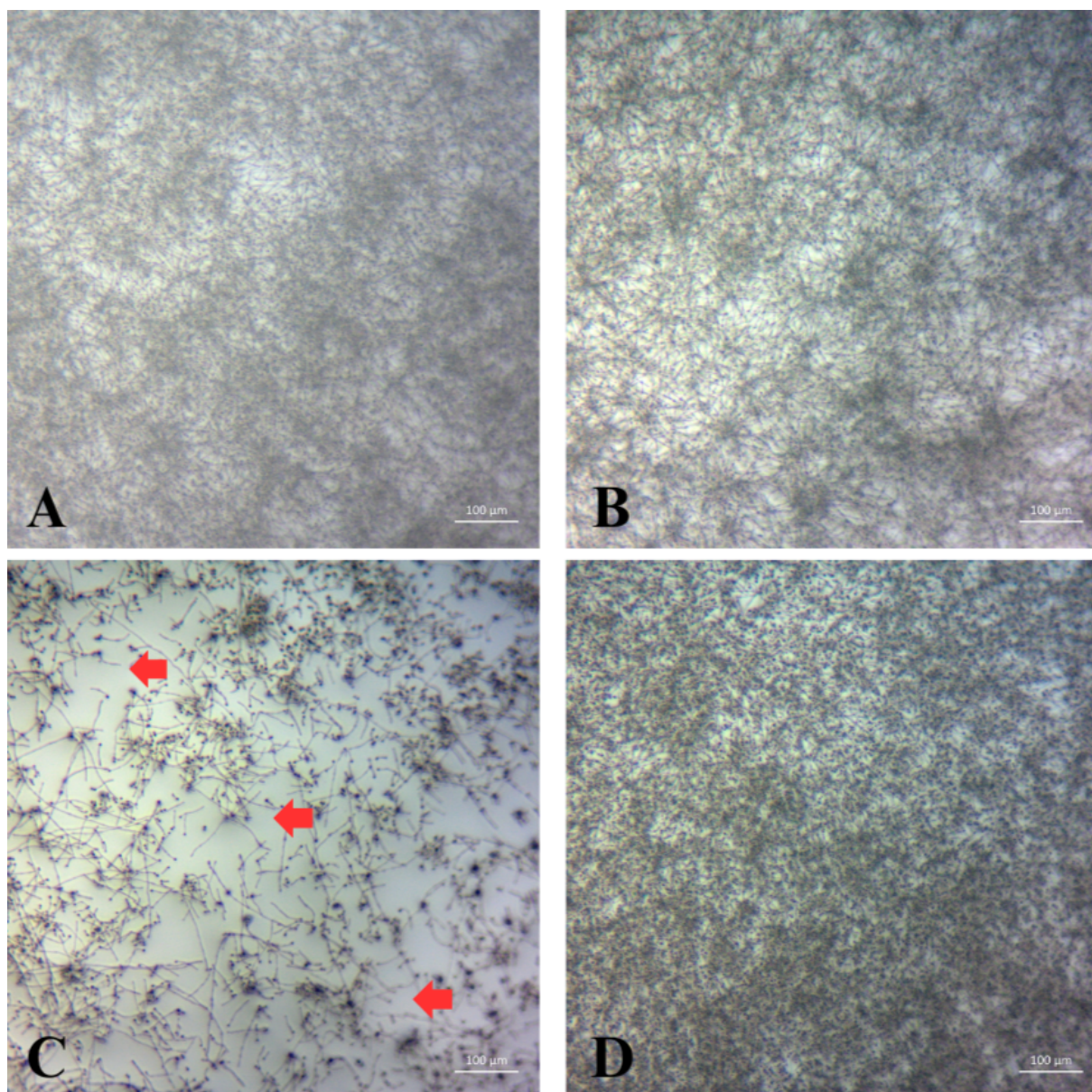


Figura 11 – Estrutura dos biofilmes de *Candida albicans* formados em 24 e 48 horas com diferentes concentrações iniciais de células ($1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ células/mL) em placas de 96 poços. Nas imagens A e B, são exibidos biofilmes formados com a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL após 24 h e 48 h de incubação, respectivamente. As imagens C e D mostram biofilmes formados a partir da concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL, com a formação observada após 24 h e 48 h de incubação. As setas vermelhas indicam a ruptura do biofilme após a lavagem. A barra de escala (100 μm) está localizada no canto inferior direito de cada imagem.

versidade de células, poderia ser considerado maduro (Kaneko *et al.*, 2013; Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016). Outrossim, a figura 11 revela semelhança entre condições testadas para a formação dos biofilmes: de 24 horas na concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ células/mL (Figura 11A) e de 48 horas na mesma concentração (Figura 11B).

Entretanto, a condição de 24 h a partir da concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL foi

descartada pela falta de integridade do biofilme (Figura 11C). Após a etapa de lavagem, foram vistas falhas na estrutura, provavelmente ocasionadas pela perda de células durante o procedimento. Portanto, não foi viável observar a morfologia característica de biofilme: heterogênea, composta por uma rede densa de células e matriz extracelular (Pierce *et al.*, 2010; Ahmady *et al.*, 2024). Outrossim, variações na quantidade de células nos biofilmes afetam diretamente a resistência deles a antifúngicos, sendo que biofilmes de *Candida albicans* SC5314 com alta densidade celular (10^7) podem necessitar de uma concentração de anfotericina B 64 vezes maior para atingir a mesma inibição que os de menor densidade (10^3) (Perumal; Mekala; Chaffin, 2007).

Nesta otimização, no quesito suscetibilidade à anfotericina B avaliada pelo ensaio colorimétrico do XTT, não houve diferenças significativas entre as atividades metabólicas de biofilmes desenvolvidos a partir das concentrações de $1,0 \times 10^6$ células/mL e de $1,0 \times 10^7$ células/mL (Figura 12). Tal resultado, entre as concentrações, se repetiu tanto em biofilmes de 24 quanto nos de 48 horas. Por fim, a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL foi selecionada, conforme artigos publicados do grupo de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Patogênicos (Dias *et al.*, 2020). Por conseguinte, para as otimizações posteriores, foi escolhida a condição experimental de biofilme de 24 h a partir de uma concentração $1,0 \times 10^6$ células/mL.

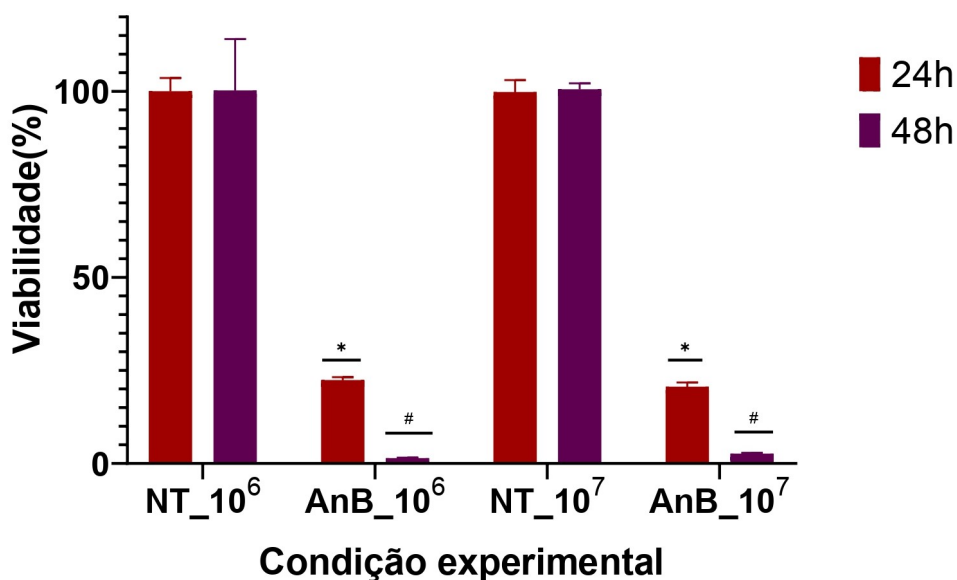


Figura 12 – Viabilidade pelo método XTT dos biofilmes de *Candida albicans* formados em 24 e 48 horas com diferentes concentrações iniciais de células ($1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ células/mL), nas condições de controle de crescimento fúngico (NT) e exposto à anfotericina B a $1 \mu\text{g/mL}$ (AnB). Os dados são expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle de crescimento fúngico (100%). As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *P < 0,05 *vs.* controle de crescimento fúngico (NT) no tempo de 24h; #P < 0,05 *vs.* controle de crescimento fúngico (NT) no tempo de 48h.

4.1.2 Soro fetal bovino e avaliação colorimétrica

Os soros são estudados há mais de 50 anos como forma de induzir filamentação em *C. albicans*, associado a condições como aumento de temperatura e disponibilidade de glicose (Landau; Dabrowa; Newcomer, 1965; Barlow; Aldersley; Chattaway, 1974; Gutzmann *et al.*, 2024). O uso de soro de mamíferos para estimular a filamentação de *C. albicans* é feito também com o objetivo de imitar o ambiente *in vivo* de hospedeiros (Sachivkina; Podoprigora; Bokov, 2021). Somado a isso, não apenas a presença de SFB resultou em um aumento significativo no desenvolvimento do biofilme em ensaios de quantificação de biomassa, como também uma maior formação de tubo germinativo em análises microscópicas (Delaney, 2021).

Além disso, a proteína albumina sérica é abundante em SFB e, principalmente quando não ligada a ácidos graxos, possui a capacidade de se ligar ao farnesol livre e sequestrá-lo (Gutzmann *et al.*, 2024). O farnesol é uma molécula de comunicação célula-a-célula (*quorum-sensing*) responsável pela inibição da transição levedura-hifa em *C. albicans*, processo essencial para a formação e para a regulação do biofilme (Ramage *et al.*, 2002). Os níveis desta molécula são autorregulados pelo fungo e as alterações estão relacionadas com mecanismos celulares distintos, como resposta ao estresse, sensibilidade a antifúngicos e mudanças de morfologia (Nickerson *et al.*, 2024).

Devido à relevância dos soros em estudos com *C. albicans*, foram feitos experimentos a fim de testar a exposição dos poços ao SFB antes do plaqueamento de células para o desenvolvimento do biofilme. Na análise feita no microscópio invertido, as imagens observadas apresentaram aspecto de rede tridimensional estruturada, típico de biofilme de *C. albicans* (Ahmady *et al.*, 2024). Morfologicamente, a prévia exposição ao SFB não ocasionou diferenças em relação ao biofilme sem soro (Figura 13). Tais morfologias presentes em poços expostos ao SFB (Figura 13B e 13D) e em poços sem o soro (Figura 13A e 13C) contêm leveduras, filamentação e matriz extracelular.

No entanto, as mudanças causadas pelo SFB nestes biofilmes podem estar relacionadas a um aspecto além do morfológico. Visto que a adaptação de *Candida albicans* ao SFB leva à regulação de processos celulares durante o desenvolvimento de hifas, como aumento de: aquisição de energia; metabolismo de lipídios; resposta ao estresse; apoptose e produção de proteínas de adesão para estabelecimento de um ponto de apoio ao biofilme (Aoki *et al.*, 2013). Outrossim, biofilmes de *C. albicans* também regulam positivamente a expressão de genes de virulência, incluindo os *HWP1* e *ALS3*, associados ao crescimento invasivo e à indução de endocitose (Samaranayake *et al.*, 2013). Mutações no gene *ALS3*, por exemplo, formam biofilmes desorganizados e finos, com cerca de metade da biomassa comparados aos de tipo selvagem (Zhao *et al.*, 2006).

Para a avaliação da viabilidade destes biofilmes, foram testados dois ensaios de

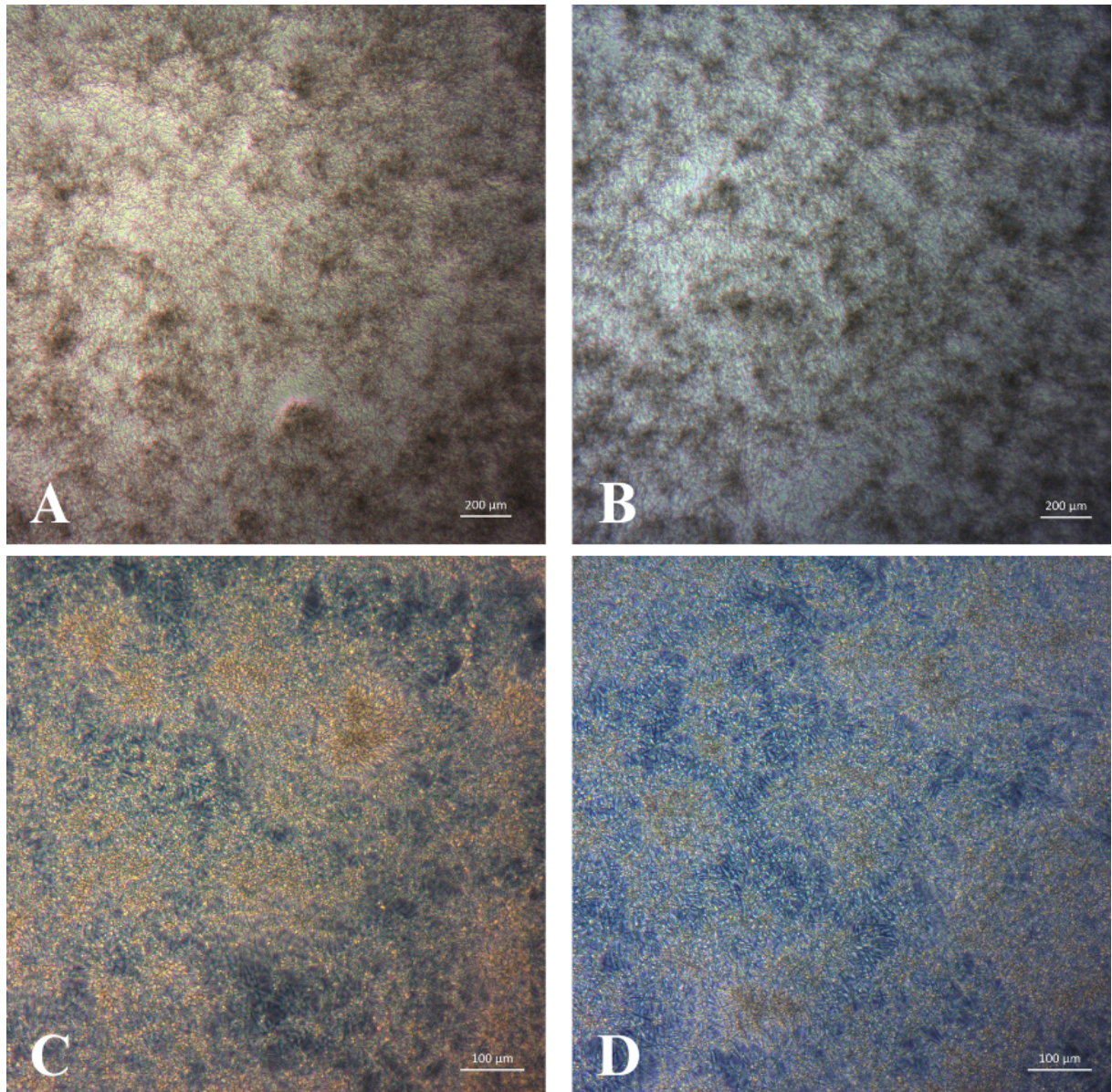


Figura 13 – Estrutura de biofilmes de 24 horas formados a partir da concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ células/mL testando a exposição ao soro fetal bovino (SFB). Em A e C, observam-se biofilmes formados em poços não expostos previamente ao SFB, enquanto B e D mostram biofilmes desenvolvidos em poços com exposição prévia ao SFB. Não há diferenças consideráveis na morfologia destes biofilmes ao comparar A com B e C com D. As imagens A e B mostram rede densa de células em um fundo branco, enquanto nas imagens C e D esta rede está em contraste com fundo azul escuro. As barras de escala brancas no canto inferior direito representam $200 \mu\text{m}$ em A e B, e $100 \mu\text{m}$ em C e D.

atividade metabólica, ambos métodos colorimétricos. Ensaio de biorredução, como XTT (*2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida*), podem ser usados para medir atividade citotóxica e apresentam-se eficientes da mesma forma que o teste de contagem de colônias viáveis (Ramage *et al.*, 2001; Filipić *et al.*, 2024). Outrossim, tal correlação também é observada em ensaios de viabilidade que utilizam resazurina em biofilmes de *C. albicans*, os quais mostram maior sensibilidade em resultados medidos em fluorescência (Repp; Menor; Pettit, 2007; Filipić *et al.*, 2024).

Portanto, a viabilidade destes biofilmes foi avaliada por XTT e pela resazurina. Os grupos controles de crescimento fúngico (NT) tiveram mudança na coloração como esperado de biofilmes viáveis, cujo metabolismo está ativo. Esses grupos avaliados pelo XTT ficaram alaranjados, enquanto pela resazurina ficaram rosados (Figura 14). Outrossim, os grupos controles de atividade antifúngica, por meio de anfotericina B, não tiveram mudanças expressivas de coloração, permanecendo amarelados (método XTT) e azulados (método da resazurina) (Figura 14).

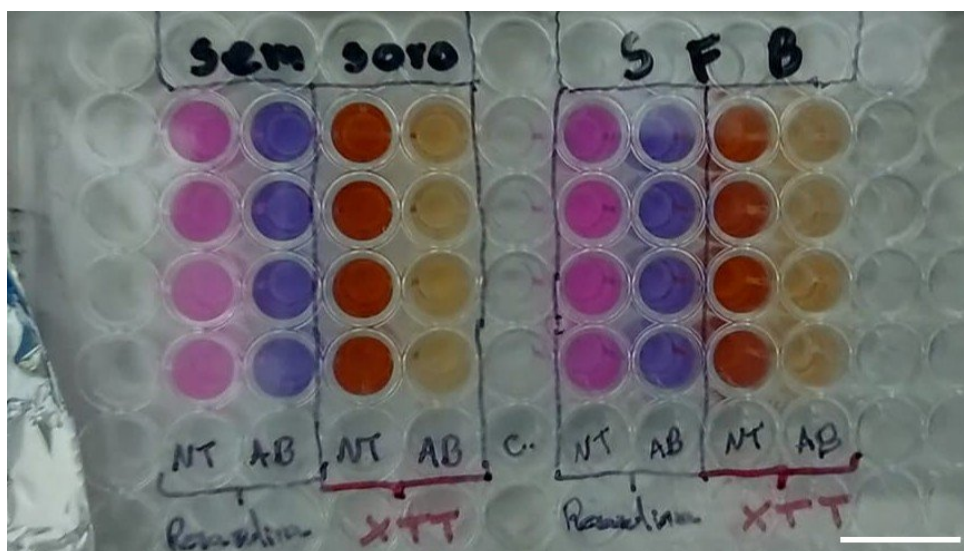


Figura 14 – Ensaio de viabilidade de biofilmes de *Candida albicans* pelos métodos colorimétricos da resazurina e do XTT. À esquerda, quatro quadruplicatas de biofilmes formados sem a exposição ao SFB. À direita, quatro quadruplicatas de biofilmes formados com a exposição prévia dos poços ao SFB. Os testes feitos com a resazurina estão: em rosa, controle de crescimento fúngico (NT) e, em azul, controle de atividade antifúngica (AB). Enquanto, os ensaios com XTT estão: em laranja, controle de crescimento fúngico (NT) e, em amarelo, controle de atividade antifúngica (AB). A barra de escala branca, localizada no canto inferior direito, representa 1 cm.

Essa mudança de cor ocorre devido a propriedades cromogênicas do XTT e da resazurina. Desta maneira, assim que reduzidos por oxidoredutases e desidrogenases dependentes de NAD(P)H, há formação de formazan (laranja) e de resofurina (rosa), respectivamente (Braissant *et al.*, 2020). Tais colorações ratificaram os resultados quantitativos que apresentaram, em ambos os testes, diferenças estatísticas significativas entre os con-

troles de crescimento fúngico (NT) e os controles de atividade antifúngica (anfotericina B - AnB) (Figura 15). Além disso, tanto no XTT quanto na resazurina, não houve distinção na estatística de valores entre os grupos não tratados sem soro e com exposição ao SFB e entre os controles de anfotericina B sem soro e com exposição ao SFB (Figura 15). Estas análises foram feitas separadamente, respeitando os valores absolutos de cada teste, absorvância para o XTT e fluorescência para resazurina.

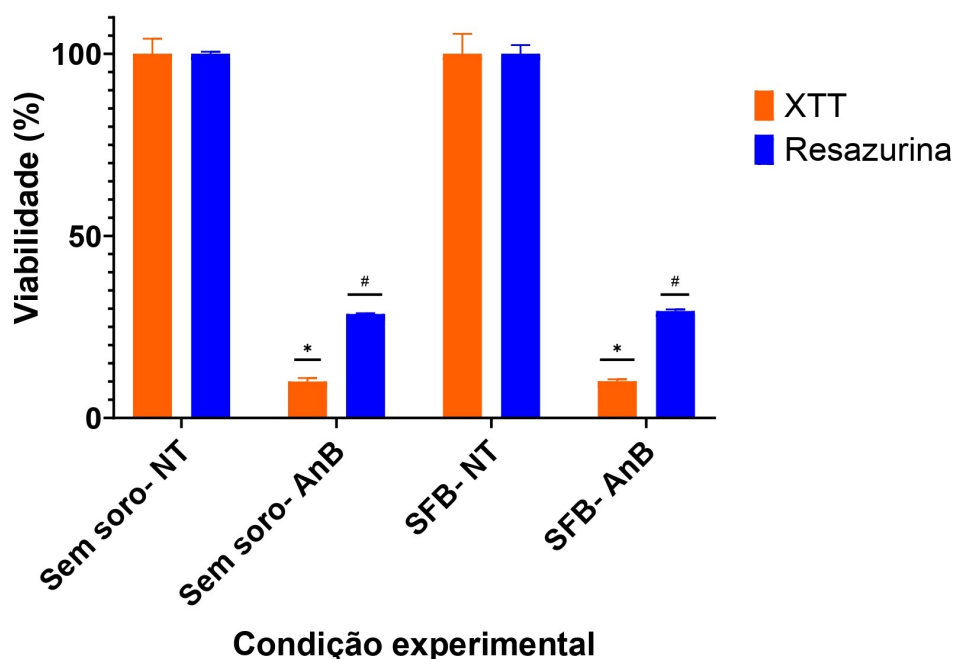


Figura 15 – Viabilidade dos biofilmes de *Candida albicans* determinada pelos ensaios colorimétricos de XTT (laranja) e resazurina (azul) em diferentes condições experimentais: sem soro (NT: controle de crescimento fúngico e AnB: exposto à anfotericina B a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e em poços previamente expostos ao soro fetal bovino (SFB-NT: controle de crescimento fúngico e SFB-AnB: exposto à anfotericina B). Os dados são expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle de crescimento fúngico (100%). As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). *P < 0,05 vs. controle de crescimento fúngico (NT) do método XTT; #P < 0,05 vs. controle de crescimento fúngico (NT) do método resazurina.

A avaliação das porcentagens normalizadas, pelos grupos controles de crescimento fúngico de cada condição (sem soro e exposto ao SFB) e de cada teste colorimétrico (XTT e resazurina), mostrou diferença estatística entre os grupos expostos ao antifúngico (AnB). Ou seja, os biofilmes avaliados pela resazurina tiveram maior resistência à anfotericina B quando comparados aos biofilmes avaliados por XTT. Esta análise ratificou que a resazurina possui maior sensibilidade em comparação ao XTT (Scorzoni *et al.*, 2016). Logo, foi selecionada para os próximos experimentos a avaliação metabólica pelo método colorimétrico da resazurina, com leitura de fluorescência.

4.1.3 Anfotericina B

Espécies de *Candida sp.* possuem resistência a fármacos antifúngicos mesmo no estado de células planctônicas. Estes mecanismos incluem a superexpressão de bombas de efluxo e as mutações em genes relacionados a componentes da parede celular e a enzimas-alvo de fármacos (Lee *et al.*, 2021). Quando em estado de biofilme, essa resistência pode ser somada a outros processos multifatoriais e mecanicamente complexos. Os quais estão principalmente atribuídos à matriz extracelular, à regulação dessas bombas de efluxo e à presença de células persistentes (Kaur; Nobile, 2023).

Por conta disso, somente alguns antifúngicos são indicados para o tratamento de infecções invasivas, como formulações de anfotericina B (Marcos-Zambrano *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2022). A resistência à anfotericina B é rara, possivelmente pela dificuldade de evolução neste contexto, uma vez que mutantes de *C. albicans* resistentes apresentam hipersensibilidade a estresse oxidativo, a temperaturas elevadas e prejuízos na filamentação, consequentemente na invasão de tecidos de hospedeiros (Vincent *et al.*, 2013).

Dito isso, este agente fungicida foi escolhido como controle positivo de atividade antifúngica nos ensaios biológicos desta pesquisa. A concentração de inibição de biofilmes de *C. albicans* SC5314 maduros foi baseada em estudo anterior que reportou 1 $\mu\text{g/mL}$ para reduzir em 50% a viabilidade, quando incubada por 24 h (Dias *et al.*, 2020). Todavia, na TFD, o tempo de exposição à nanoemulsão de AlPc foi de 30 minutos. Portanto, o controle positivo de atividade antifúngica também deve seguir às mesmas condições testadas, não podendo ser utilizada a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ válida para incubação por 24 h. Tal questão impulsionou esta padronização da quantidade ideal de anfotericina B em novo protocolo, testando as concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ e de 4 $\mu\text{g/mL}$.

Nesta otimização, a exposição ao antifúngico resultou na perda de viabilidade dos biofilmes (Figura 16), conforme esperado. Entretanto, nenhuma das concentrações produziu diferenças estatisticamente significativas quando comparadas dentro de seus grupos experimentais (SFB e sem soro). Outrossim, os biofilmes sem exposição ao soro tiveram maior suscetibilidade às duas concentrações do antifúngico quando comparados aos biofilmes formados em poços expostos previamente ao SFB. Tal fato corrobora a análise feita anteriormente no primeiro experimento que testou o uso de SFB (subseção 4.1.2).

Além disso, o procedimento de lavagem neste experimento desencadeou o desprendimento significativo de células dos poços sem exposição prévia ao SFB, apresentando falhas nos biofilmes visíveis macroscopicamente (Figura 17B). Isso influenciou diretamente no resultado da avaliação colorimétrica por resazurina, em que é possível verificar a coloração fracamente rosada das quadruplicatas do grupo controle de crescimento fúngico (NT) sem soro (Figura 17A). Tal resultado também se refletiu na análise dos valores absolutos de fluorescência, pois a condição controle de crescimento fúngico sem soro é

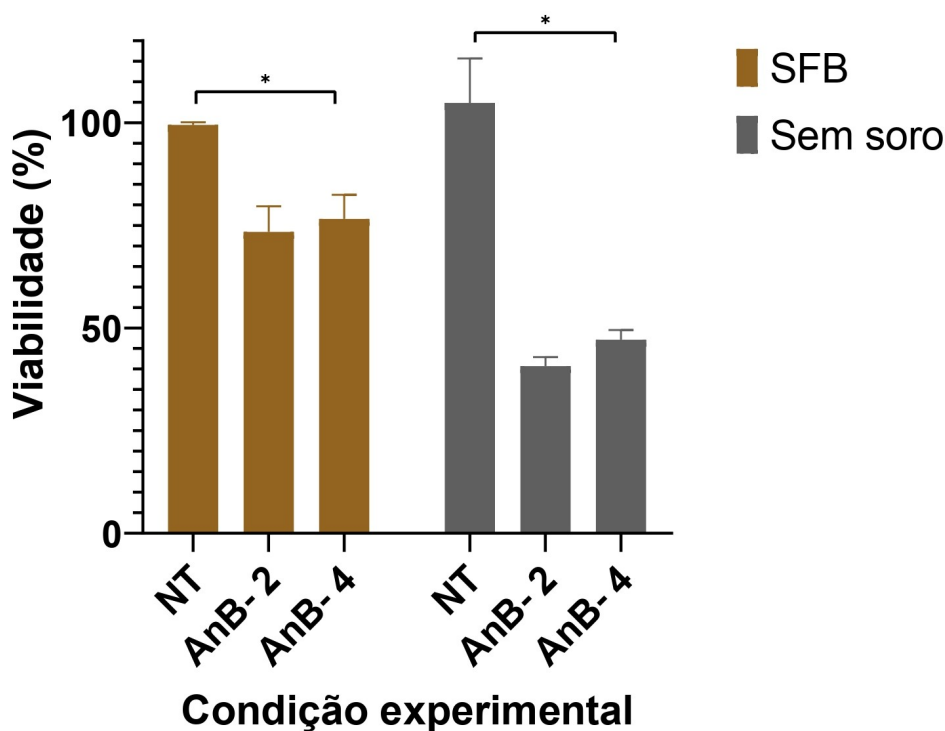


Figura 16 – Viabilidade pelo método da resazurina dos biofilmes de *Candida albicans* expostos à anfotericina B em concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ (AnB-2) e de 4 $\mu\text{g/mL}$ (AnB-4) por 30 minutos. Os ensaios foram realizados em poços previamente expostos ao soro fetal bovino (SFB) e em poços sem soro (Sem soro). As condições controle de crescimento fúngico (NT) também foram avaliadas. Os dados são expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle de crescimento fúngico (100%). As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $P < 0,05$ vs. controle de crescimento fúngico (NT).

estatisticamente diferente da condição controle de crescimento fúngico em poços expostos ao SFB.

Uma etapa crítica no início do desenvolvimento do biofilme é a adesão, em que as células se fixam ao substrato e umas às outras, ocasionando agregação celular e produção de hifas. Com isso, mínimas diferenças no material desta superfície acarretam respostas distintas, mediadas por reguladores genéticos (Gulati; Nobile, 2016). Outrossim, a perda da integridade da estrutura do biofilme, por exemplo, danos à matriz, interfere diretamente na resistência dos fungos a antimicrobianos, uma vez que pode atuar como barreira física (Al-Fattani; Douglas, 2006).

Além de um impedimento físico de biodisponibilidade de fármacos, essa matriz autoproduzida que envolve as células é feita de biopolímeros, principalmente proteínas e carboidratos (Zarnowski *et al.*, 2014). Entre eles, os β -1,3-glucanos são componentes estruturais que possuem afinidade com antifúngicos, como fluconazol e anfotericina B, tendo a capacidade de retê-los na matriz antes de chegarem às células-alvo (Vediyappan; Ros-signal; d'Enfert, 2010). Desta forma, a falta de integridade desta matriz, como observada

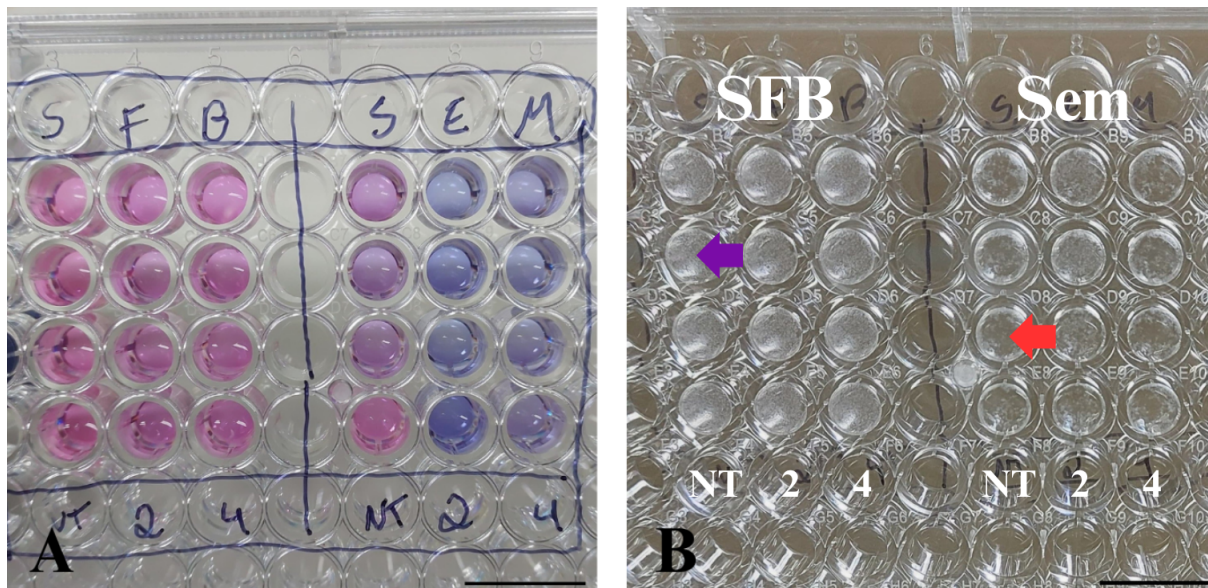


Figura 17 – Ensaio de concentração de anfotericina B (AnB) para exposição por 30 minutos. À esquerda de cada imagem, mostram-se três colunas de quadruplicatas de biofilmes formados com a exposição prévia dos poços ao SFB (SFB) e, à direita, três colunas sem a exposição ao soro (Sem). Os grupos experimentais são identificados como: NT, controle de crescimento fúngico; 2, concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ de AnB; 4, concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ de AnB. Em A, os resultados de coloração do teste com resazurina, em rosa, biofilmes com metabolismo ativo e, em azul e em roxo, biofilmes com menor atividade metabólica. Em B, observam-se poços após as lavagens iniciais dos biofilmes. Seta roxa aponta um biofilme íntegro do grupo experimental de exposição prévia ao SFB (à esquerda). Seta vermelha indica ruptura dos biofilmes sem contato com SFB (à direita). As barras de escala preta, localizadas no cantos inferiores direitos, representam 1 cm.

na figura 17B, leva à maior suscetibilidade à anfotericina B (Figura 17A). Em virtude do desprendimento dos biofilmes sem soro após a lavagem, a condição de exposição prévia dos poços ao soro fetal bovino foi escolhida para os ensaios posteriores.

4.1.4 Marcas de placas de poliestireno

A ancoragem do biofilme ao substrato depende de uma série de respostas celulares, além da produção de hifas. Tal afirmação é ratificada em estudos que demonstram diversidade fenotípica de biofilmes gerados em placas de ágar com variação de nutrientes presentes nos meios de cultura, como aminoácidos e fontes de carbono (Dunn *et al.*, 2020). Por isso, foi testada a placa de 96 poços da marca *Corning*, em comparação com a da *Kasvi*, visando a melhor performance na formação de biofilme de *C. albicans* SC5314.

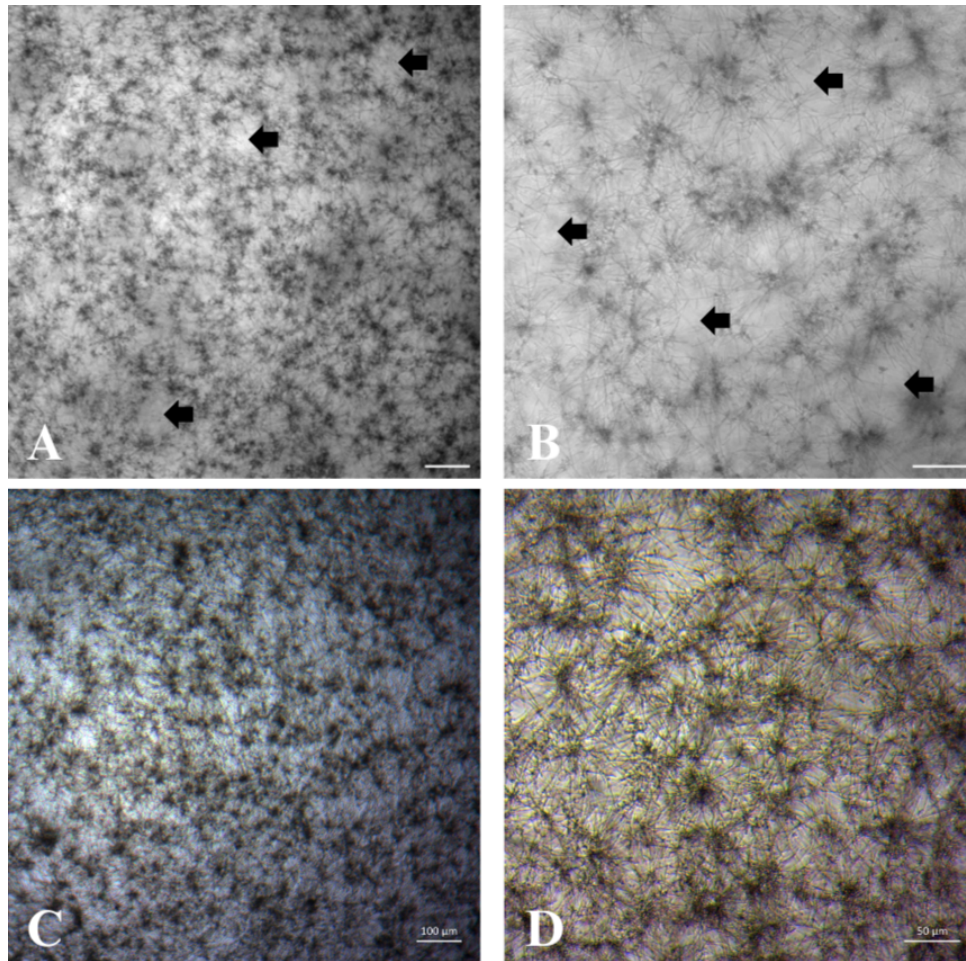


Figura 18 – Comparação do desenvolvimento de biofilmes de *Candida albicans* SC5314 em placas de 96 poços das marcas *Corning* (A e B) e *Kasvi* (C e D). Em A, observa-se a filamentação com alguns agregados de células e espaços vazios proeminentes quando comparados à imagem C. O padrão se repete em B em confronto com D. Setas pretas indicam falhas na estrutura entremeada de células, em rede. Barras de escala brancas localizadas nos cantos inferiores direitos representam 100 μm , em A e C, e 50 μm , em B e D.

Apesar da presença de filamentação, o biofilme na placa da marca *Corning* não apresentou a estrutura densa e entremeada típica de um biofilme maduro (Nobile; Johnson, 2015). Na análise no microscópio invertido, foi possível observar falhas em contraste com as morfologias desenvolvidas na placa da marca *Kasvi* (Figura 18). Logo, a condição escolhida para os principais ensaios biológicos de TFD foi a placa da marca *Kasvi*.

4.2 TFD em biofilmes de *Candida albicans*

Novas opções terapêuticas para tratar infecções fúngicas são estudadas, devido às limitações de tratamento para erradicação desses patógenos (Barros *et al.*, 2020). Este cenário é visto na espécie *Candida albicans* que possui a capacidade de formar um biofilme bem estruturado, dificultando a penetração de antifúngicos (Al-Fattani; Douglas,

2004), restringindo sua identificação e protegendo-se do sistema imunológico do hospedeiro (Chandra *et al.*, 2001). Considerando essas informações, a TFD é descrita como uma forma promissora de combater agentes infecciosos, com a possibilidade de controle espaço-temporal do tratamento e relativamente poucos efeitos colaterais (Zhou *et al.*, 2021).

A nanotecnologia utilizada nesta pesquisa, NEAlPc, demonstrou anteriormente atividade contra células planctônicas fúngicas. Nas espécies testadas do gênero *Candida spp.*, a TFD mediada por NEAlPc mostrou inibição do crescimento fúngico na concentração de 50 nM em *C. glabrata*, 25 nM em *C. parapsilosis* e 12,5 nM em *C. albicans* (Nunes, 2023). Outro estudo testando uma nanoemulsão de AlPc diferente em células de levedura planctônicas de *C. albicans* apresentou resultados semelhantes apenas na concentração de 450 nM (Rodrigues *et al.*, 2020).

Embora ambas as pesquisas tenham adotado protocolos semelhantes de TFD, as concentrações de inibição foram expressivamente distintas. Os parâmetros de TFD foram: exposição à NE por 30 minutos e irradiação a 107,49 J/cm² e a 100 J/cm², respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2020; Nunes, 2023). Essa diferença de 7,49 J/cm² influencia na atividade fotodinâmica e na inibição fúngica. Tal fato é comprovado em *Cryptococcus neoformans* expostos a uma mesma concentração de AlPc em NE por 30 min, em que a TFD com irradiação a 10 J/cm² resultou em menor viabilidade que a 5 J/cm² (Rodrigues *et al.*, 2012).

Outrossim, bons resultados contra *C. albicans* são apresentados em pesquisas com outras nanotecnologias que contêm ftalocianina mediando a TFD. No entanto, nota-se uma escassez na quantidade de estudos em biofilmes de *C. albicans* (Siqueira *et al.*, 2022). Em comparação com células não sésseis, biofilmes possuem maior resistência a antifúngicos, sendo usadas concentrações exponencialmente maiores para inibir o crescimento (Lamsal *et al.*, 2021).

Isso é ratificado ao se usar complexos de ftalocianina solúveis em água de silício (SiPc1) como FS em TFD contra *C. albicans*, houve uma completa inibição em células planctônicas na concentração de 1800 nM. Todavia, em biofilmes, a concentração mais alta, 5800 nM, só foi capaz de gerar uma inibição reduzida após irradiação em aplicações fracionadas (Mantareva *et al.*, 2011a). Por isso, os primeiros ensaios desta pesquisa foram realizados com dosagens significativamente maiores de FS em comparação à concentração inibitória mínima de 12,5 nM de NEAlPc alcançada em células não sésseis de *C. albicans* (Nunes, 2023).

Em conformidade, os ensaios biológicos de TFD descritos na seção 3.4, com biofilmes otimizados de *C. albicans*, mostraram inibição do metabolismo desses fungos (Figura 19). A mudança de coloração de azul para rosa no teste da resazurina é um indicativo visual resultante da redução do composto, consequentemente uma maneira de detectar

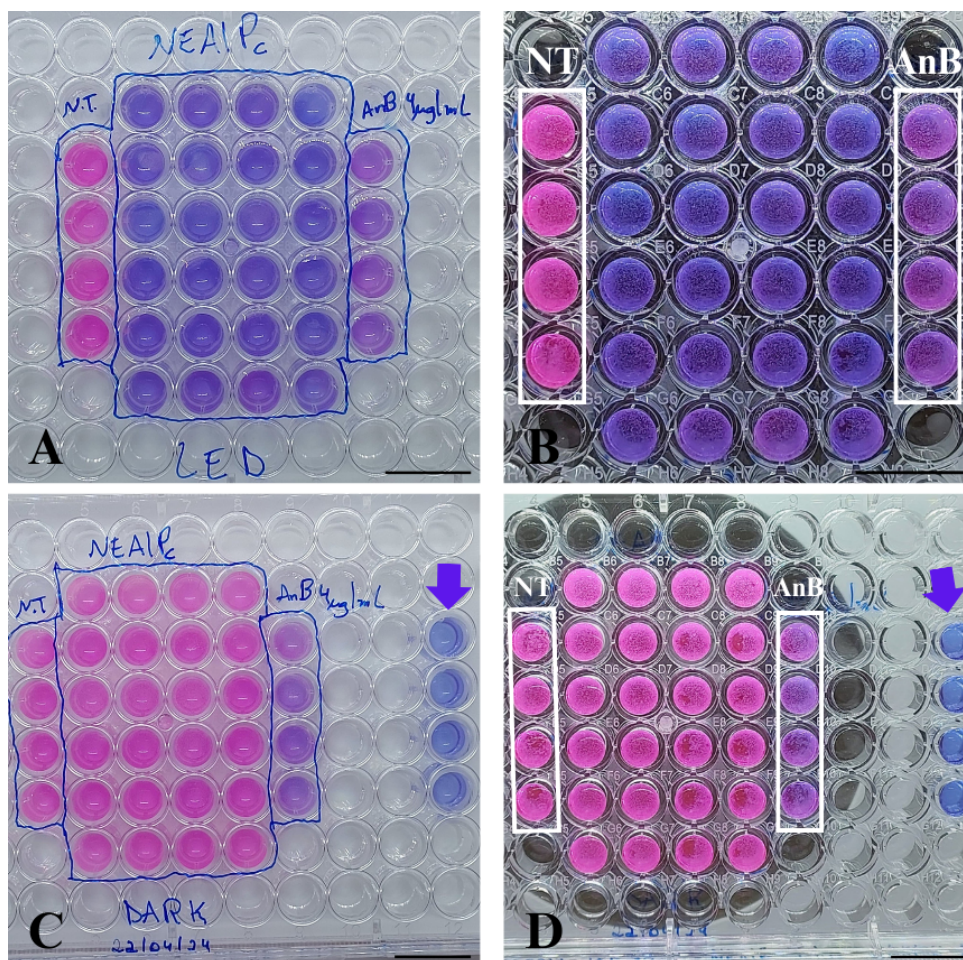


Figura 19 – Ensaio de viabilidade dos biofilmes de *Candida albicans* SC5314 avaliada pelo método da resazurina após terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc). Observam-se o controle de crescimento fúngico (NT), o de atividade antifúngica (AnB) e, ao centro, as quadruplicatas das concentrações de 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM e 0,625 μM de NEAlPc, em ordem decrescente, de cima para baixo (como descrito na seção 3.4, figura 4A). Em A e em C, respectivamente, imagens das placas “LED” e “DARK” vistas de cima. Em B e em D, imagens do fundo das placas “LED” e “DARK”, na mesma ordem, sendo possível visualizar a turbidez do biofilme pré-formado. Poços com coloração em rosa indicam biofilmes com metabolismo ativo e, em azul-violeta, menor atividade metabólica. Setas azuis apontam poços contendo solução pura de resazurina. Barras de escala pretas nos cantos inferiores direitos representam 1 cm.

células metabolicamente ativas (Herman *et al.*, 2024). Portanto, os biofilmes do controle “DARK” (Figuras 19C e 19D), sujeitos apenas à exposição à NEAlPc sem a luz, não tiveram seus metabolismos afetados, visto que ficaram rosas, assim como o controle de crescimento fúngico (NT). Em contraste, a inativação fotodinâmica (Figuras 19A e 19B) foi efetiva em todas as concentrações testadas de NEAlPc, de 20000 nM a 625 nM (20 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM e 0,625 μM).

A menor concentração (625 nM) aqui testada resultou em redução de atividade

metabólica dos biofilmes, irradiados com fluência de 108 J/cm^2 pelo LED de 660 nm. Em comparação, 800 nM de metaloporfirina tetracatiônica (ZnP hexil) resultou em 80% de redução de viabilidade a partir de ensaios de MTT, porém este FS foi exposto a uma luz de 410 nm (Souza *et al.*, 2022). Em termos de FS com ftalocianina, uma NE catiônica de zinco Pc obteve uma redução de 55,33% (0,35 log) em biofilmes de *C. albicans*. Diferencialmente, essa redução foi com irradiação de LED 660 nm com uma fluência de $26,3 \text{ J/cm}^2$ (Junqueira *et al.*, 2012).

Os ensaios seguintes foram realizados com diluições seriadas sequenciais de NE-AlPc, resultando em ao todo seis concentrações: 625 nM, 312 nM, 156 nM, 78 nM, 39 nM e 19 nM. A viabilidade dos biofilmes após a TFD com essas concentrações menores resultou em gradiente de cores, devido à redução da resazurina (Figura 20). As linhas de quadruplicatas das concentrações de NEAlPc estão em ordem decrescente, de cima para baixo (como descrito na seção 3.4, figura 4B). É possível perceber que há uma aproximação de tonalidade com o controle de crescimento fúngico (NT), em rosa, conforme as concentrações de NEAlPc diminuem (Figuras 20A e 20B). Tal transição de cor não acontece na placa controle "DARK", apenas a condição de $4 \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B apresenta discrepância do tom rosáceo (Figuras 20C e 20D).

Afim de ratificar a detecção visual do método da resazurina, foi feita uma análise quantitativa com base nos resultados de fluorescência obtidos em todos os experimentos, realizados em três dias independentes (descrito na subseção 3.5.1). Essa leitura de fluorescência garante uma maior sensibilidade de detecção de células viáveis, devido à formação de resofurina que é altamente fluorescente e medida em comprimentos de onda de excitação de 560 nm e emissão de 590 nm (Filipić *et al.*, 2024; Herman *et al.*, 2024). Desta maneira, ao se considerar a média dos valores de controle de crescimento fúngico (NT) como 100% de viabilidade, foi perceptível o efeito inibitório da TFD mediada por NEAlPc (Figura 21).

Dito isso, diferentes composições de AlPc em NE mostram variabilidade na inativação de *C. albicans*. Em outra pesquisa, biofilmes submetidos à TFD foram expostos a uma NE catiônica, a uma NE aniônica e ao AlPc livre, todos em uma concentração de 31800 nM, e posteriormente irradiados a 100 J/cm^2 com LED de 660 nm. A viabilidade fúngica avaliada pelo ensaio do XTT mostrou que, com a NE catiônica, houve uma redução de 70%, enquanto com o AlPc livre, a diminuição foi de 34%. Todavia, o resultado mais discrepante foi o da NE aniônica, que não obteve diferença na viabilidade dos biofilmes (Ribeiro *et al.*, 2012). Em contraste, nossa NEAlPc com uma concentração cerca de 19 vezes menor (625 nM) promoveu uma queda de 80% de viabilidade de biofilmes de *C. albicans* (Figura 21A). Isso se deve à composição química do FS estar intrinsecamente relacionada à eficácia da TFD (Castano; Demidova; Hamblin, 2005).

As duas NE, apesar da presença de AlPc, foram desenvolvidas por protocolos

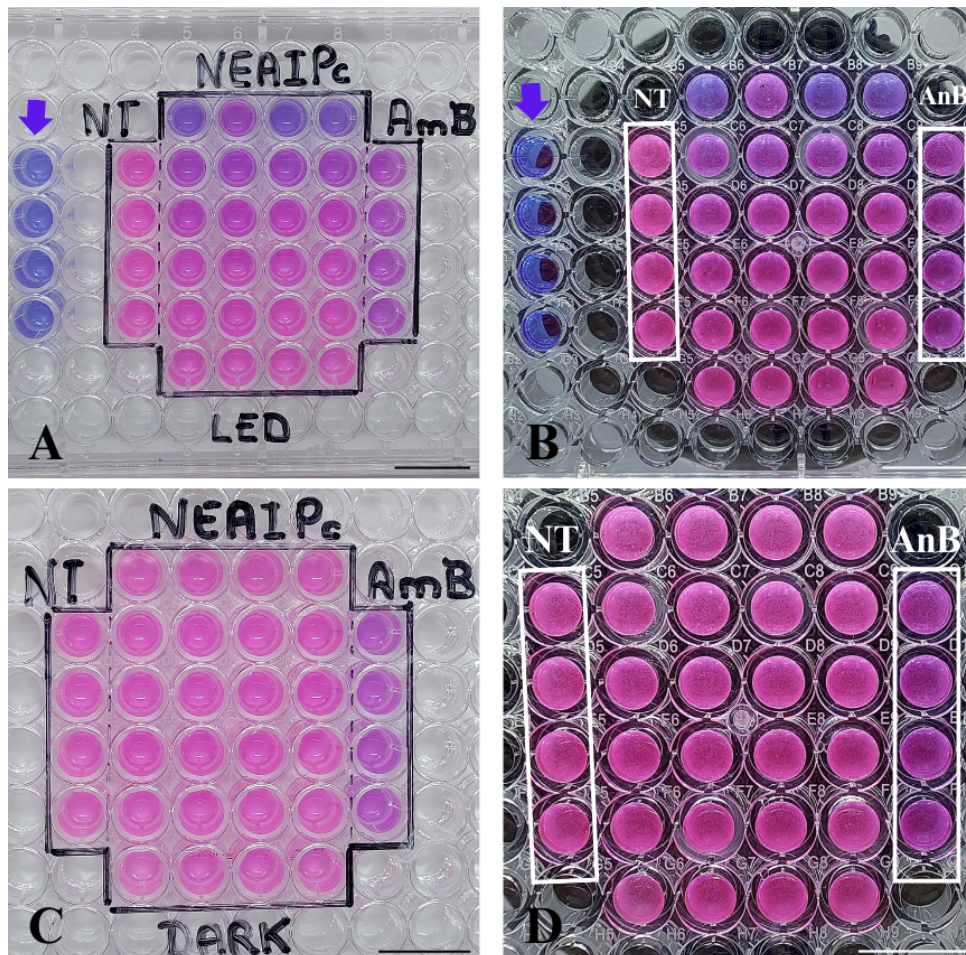


Figura 20 – Ensaio de viabilidade dos biofilmes de *Candida albicans* SC5314 avaliada pelo método da resazurina após terapia fotodinâmica com nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NEAlPc). Observam-se o controle de crescimento fúngico (NT), o de atividade antifúngica (AnB) e, ao centro, as quadruplicatas das concentrações de 625 nM, 312 nM, 156 nM, 78 nM, 39 nM e 19 nM de NEAlPc, em ordem decrescente, de cima para baixo (como descrito na seção 3.4, figura 4B). Em A e em C, respectivamente, imagens das placas “LED” e “DARK” vistas de cima. Em B e em D, imagens do fundo das placas “LED” e “DARK”, na mesma ordem, sendo possível visualizar a turbidez do biofilme pré-formado. Poços com coloração em rosa indicam biofilmes com metabolismo ativo e, em azul-violeta, menor atividade metabólica. Setas azuis apontam poços contendo solução pura de resazurina. Barras de escala pretas (A e C) e brancas (B e D), nos cantos inferiores direitos, representam 1 cm.

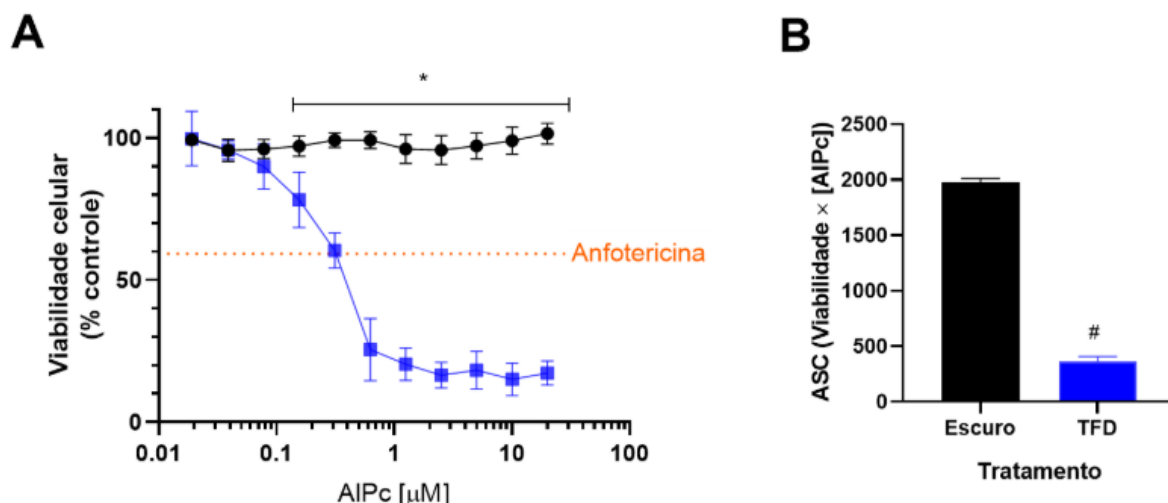


Figura 21 – Viabilidade pelo método da resazurina de biofilmes de *Candida albicans* expostos a cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc), em nanoemulsão, no escuro (linha preta) ou sob irradiação com luz vermelha (λ 660 nm, 108 J/cm²) em protocolo de terapia fotodinâmica (TFD, linha azul). Em A, é exibida a viabilidade celular em função da concentração de AlPc; a linha descontínua alaranjada expressa a viabilidade de biofilmes expostos a 4 μ g/mL de anfotericina B das placas “DARK”. *p < 0,01 para cada concentração na comparação escuro vs TFD. Em B, é expressa a área sob a curva (ASC) calculada com os resultados expressos em A; # p < 0,0001 vs escuro.

diferentes, os quais causaram mudanças nas características físico-químicas de cada uma, incluindo o potencial Zeta. Espera-se que FSs catiônicos sejam melhor internalizados, devido à presença de radicais aniônicos na superfície das células fúngicas (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Tal questão é ratificada em nanopartículas poliméricas de curcumina que mostraram atividade fotodinâmica contra biofilmes de *C. albicans* quando catiônicas, mas não reduzem a viabilidade fúngica quando aniônicas (Gutierrez *et al.*, 2017; Sakima *et al.*, 2018). Ainda assim, a NEAlPc aqui testada possui um potencial Zeta de $-0,340 \pm 0,188$ mV, sugerindo uma carga mais aniônica (Morais *et al.*, 2024).

Outra característica importante para a eficácia da TFD é o tamanho do FS, uma vez que a penetração em biofilmes pode ocorrer por meio de difusão em canais de água quando os nanossistemas têm até 130 nm, permitindo uma maior entrega de FS (Liu *et al.*, 2019). Tal fato é confirmado em maior inibição de micro-organismos quando há uma diminuição de nanopartículas com FS, de aproximadamente 260 nm para 80 nm (Chen; Chen; Tsai, 2012; Fabio *et al.*, 2023). Desta forma, a NEAlPc avaliada possui um diâmetro hidrodinâmico de $27,15 \pm 1,070$ nm (Morais *et al.*, 2024) e este tamanho reduzido pode explicar a presença de inibição metabólica até a concentração de 156 nM (Figura 21A). Semelhantemente, micelas poliméricas carregadas com azul de metileno com diâmetros de $25,8 \pm 1,8$ nm, também tiveram atividade fotodinâmica contra biofilmes de *C. albicans* (Soares *et al.*, 2023).

Os efeitos observados da NEAlPc foram intrinsecamente relacionados à TFD, ou seja, à irradiação das placas com o LED de 660 nm desenvolvido no IF da UnB. Tal evidência é corroborada com a diferença estatística significativa entre os controles do escuro ("*DARK*") e os biofilmes inativados fotodinamicamente ("*LED*") (Figura 21B). Esta avaliação da NEAlPc quando não irradiada é essencial na TFD, pois procura-se idealmente FSs que possuem baixa toxicidade no escuro (Gunaydin; Gedik; Ayan, 2021).

Além disso, confirmando o ensaio colorimétrico da resazurina, o teste de contagem de UFC mostrou diferença entre os biofilmes irradiados (TFD) e não irradiados (Figura 22). Em concordância, resultados de TFD mediada por outros derivados de Pc também foram expressivos contra micro-organismos. Biofilmes de *C. albicans* foram inativados após TFD com irradiação de 50 J/cm² (635 nm) e 6000 nM de complexos de Pc de gálio (III) catiônicas solúveis em água e de zinco Pc (Mantareva *et al.*, 2011b). Outrossim, em um biofilme multiespécies composto por *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*, a TFD mediada por AlPc encapsulado em nanopartículas de quitosana obteve uma redução de 100 vezes o número de células viáveis comparada ao controle (Cavalcante *et al.*, 2022).

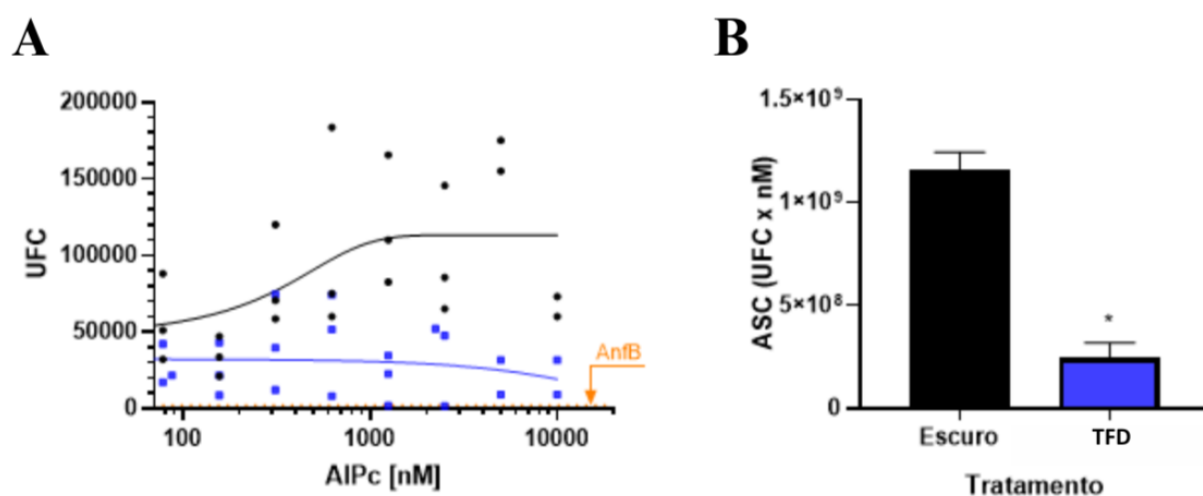


Figura 22 – Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de biofilmes de *Candida albicans* após exposição à nanoemulsão (NE) contendo cloreto de alumínio-ftalocianina (AlPc) no escuro (linha preta) ou sob irradiação com luz vermelha (λ 660 nm, 108 J/cm²) em protocolo de terapia fotodinâmica (TFD, linha azul). Em A, é exibido o número de UFC em função da concentração de AlPc; a linha descontínua alaranjada expressa a UFC de biofilmes expostos a 4 µg/mL de anfotericina B das placas "*DARK*". Os quadrados azuis representam as replicatas irradiadas (TFD), enquanto os círculos pretos representam as replicatas não irradiadas (escuro). As linhas representam as curvas de tendência para cada condição. Em B, é expressa a área sob a curva (ASC) de UFC em função da concentração de AlPc em nM; *p < 0,001 vs Escuro.

Modelos de biofilmes estáticos *in vitro* são frequentemente usados em pesquisas, porém não apresentam o mesmo desenvolvimento de biofilmes *in vivo* (Yawata *et al.*,

2016). As células de *C. albicans in vivo* normalmente estão sob fluxo constante, sofrendo descolamento contínuo, por exemplo na cavidade oral (Dijck *et al.*, 2018). Embora ainda não haja a aplicação de TFD com essa NEAlPc em modelos *in vivo* de *C. albicans*, outra NE com AlPc encapsulado apresentou resultados positivos em lesões orais de camundongos imunocomprometidos (Carmello *et al.*, 2016). Essa TFD foi capaz de reduzir a infecção por *C. albicans* e não promoveu efeitos adversos no tecido da língua; em sete dias, os animais estavam saudáveis (Carmello *et al.*, 2016).

Um desafio das NEs é que podem gerar reações tóxicas em altas dosagens, devido aos surfactantes presentes nas formulações (Pavoni *et al.*, 2020). Entretanto, nossa NEAlPc não mostrou sinais de toxicidade em camundongos BALB/c fêmeas saudáveis durante a avaliação de efeitos antileishmania. Os animais foram expostos topicamente na base da cauda com uma dose de 50 μ L de NEAlPc a cada três dias durante 15 dias. Além deste ensaio, não foi detectado acúmulo de AlPc em nenhum órgão extraído posteriormente (Pinto *et al.*, 2021). Por fim, com o objetivo de estudar os efeitos da TFD mediada por esta NEAlPc em tecido gengival normal, 40 μ L de NEAlPc foram injetados sete dias antes da extração de dente de pacientes. Essa terapia foi bem tolerada, com breves efeitos adversos e todos reversíveis (Moraes *et al.*, 2015).

5 Conclusão

Os resultados ressaltam que a TFD mediada por NEAlPc possui efeito antibiofilme em modelos com *Candida albicans*. Primeiramente, a otimização de protocolo para o estabelecimento de um biofilme bem estruturado *in vitro* resultou em uma exposição prévia ao SFB da superfície a ser formada o biofilme, o qual é feito a partir estoque de células na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL a serem plaqueadas e mantidas 24 h na estufa de 37 °C. Posteriormente, a padronização da TFD permitiu testes de exposição a concentrações de NEAlPc que variam de 20000 nM a 19 nM, com irradiação a 108 J/cm², 30 min, de LED 660 nm desenvolvido no IF da UnB. Finalmente, as avaliações de viabilidade fúngica, pelo método colorimétrico da resazurina e por ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias, resultaram em inibição estatisticamente significativa dos biofilmes de *C. albicans*. Por conseguinte, é plausível considerar o potencial da TFD mediada por NEAlPc como uma alternativa para o combate à candidíase.

5.1 Perspectivas

Este trabalho de TFD mediada por NEAlPc em biofilmes de *C. albicans* pode ser aprimorado com, correlacionado com e expandido para:

- microscopia eletrônica de varredura, afim de observar efeitos da TFD com NEAlPc na morfologia dos biofilmes de *C. albicans*;
- microscopia confocal de varredura a laser, para avaliar internalização e localização da NEAlPc nos biofilmes de *C. albicans*;
- futuros ensaios *in vivo* com *C. albicans*;
- avaliação de efeito da TFD com NEAlPc em biofilmes multiespécies, como *C. albicans* associada a *Streptococcus spp.* ou a *Staphylococcus spp.*;
- avaliação de efeito da TFD com NEAlPc em outras espécies de *Candida spp.*, como *C. auris*;
- avaliação de efeito da TFD com NEAlPc em fungos causadores de infecções de pele, como *Fonsecaea spp.*.

Referências

- Ahmady, L. *et al.* Antifungal drug resistance in candida: a special emphasis on amphotericin b. *APMIS*, Wiley, Hoboken, NJ, USA, v. 132, n. 5, p. 291–316, 2024. ISSN 0903-4641. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apm.13389>>. Citado 2 vezes nas páginas 47 e 48.
- Ahmeda, M.; Ahmida, N.; Ahmeida, A. Introduction to nanotechnology: definition, terms, occurrence and applications in environment. *Libyan International Medical University Journal*, Thieme Medical and Scientific Publishers Pvt. Ltd., v. 02, n. 01, p. 12–26, 2017. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.21502/limuj.003.02.2017>>. Citado na página 23.
- Ajetunmobi, O. H. *et al.* Antifungal therapy of *Candida* biofilms: Past, present and future. *Biofilm*, v. 5, p. 100126, 2023. ISSN 2590-2075. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590207523000230>>. Citado na página 19.
- Al-Fattani, M. A.; Douglas, L. J. Penetration of candida biofilms by antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 3291–3297, 2004. Citado na página 56.
- Al-Fattani, M. A.; Douglas, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, Microbiology Society, v. 55, n. 8, p. 999–1008, 2006. ISSN 1473-5644. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46569-0>>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 53.
- Al-Hussin, A.; Alsayed, R.; Yousif, E. Drug delivery and nano carriers-a review. *International Journal of Research in Engineering and Innovation*, International Journal of Research in Engineering and Innovation, v. 1, n. 6, p. 27–34, 2017. ISSN 2456-6934. Disponível em: <<http://www.ijrei.com>>. Citado na página 23.
- Algorri, J. F. *et al.* Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: A critical review. *Cancers*, v. 13, n. 14, p. 3484, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cancers13143484>>. Citado na página 25.
- Almeida, J. *et al.* Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiol Sci*, v. 13, p. 626–633, 2014. Citado na página 26.
- Anton, N.; Vandamme, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, v. 377, n. 1, p. 142–147, 2009. ISSN 0378-5173. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309003068>>. Citado na página 24.
- Aoki, W. *et al.* Time-course proteomic profile of *Candida albicans* during adaptation to a fetal serum. *Pathogens and Disease*, v. 67, n. 1, p. 67–75, 02 2013. ISSN 2049-632X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12003>>. Citado na página 48.

Ash, C. *et al.* Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers in Medical Science*, v. 32, p. 1909–1918, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-017-2317-4>>. Citado na página 25.

Asmundsdóttir, L. R. *et al.* The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. 6, p. 576–585, 2009. ISSN 1198-743X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14604481>>. Citado na página 17.

Barlow, A. J. E.; Aldersley, T.; Chattaway, F. W. Factors present in serum and seminal plasma which promote germ-tube formation and mycelial growth of *Candida albicans*. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 82, n. 2, p. 261–272, 1974. ISSN 1465-2080. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-82-2-261>>. Citado na página 48.

Barros, P. P. de *et al.* Biofilmes de candida: uma atualização sobre mecanismos de desenvolvimento e desafios terapêuticos. *Mycopathologia*, v. 185, p. 415–424, 2020. Citado na página 55.

Braissant, O. *et al.* A review of methods to determine viability, vitality, and metabolic rates in microbiology. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.547458>>. Citado na página 50.

Cangussu, L. M. B. *et al.* Photodynamic therapy mediated by nanoparticles aluminum chloro phthalocyanine in oral squamous carcinoma cells. *Lasers in Medical Science*, Springer, Berlin, Germany, v. 37, n. 5, p. 2509–2516, Jul 2022. Epub 2022 Feb 4. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-022-03517-z>>. Citado na página 24.

Carmello, J. *et al.* In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. *Oral Diseases*, Wiley, v. 22, n. 5, p. 415–422, 2016. ISSN 1354-523X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/odi.12466>>. Citado na página 62.

Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 1, p. 1–23, 2005. ISSN 1572-1000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157210000500030X>>. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 58.

Cavalcante, L. *et al.* Photoinactivation of multispecies cariogenic biofilm mediated by aluminum phthalocyanine chloride encapsulated in chitosan nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, v. 37, p. 2033–2043, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-021-03466-z>>. Citado na página 61.

Chandra, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 09 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001>>. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 56.

- Chen, C.-P.; Chen, C.-T.; Tsai, T. Chitosan nanoparticles for antimicrobial photodynamic inactivation: Characterization and in vitro investigation. *Photochemistry and Photobiology*, Wiley, Hoboken, NJ, USA, v. 88, n. 3, p. 570–576, 05 2012. ISSN 0031-8655. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01101.x>>. Citado na página 60.
- Chen, H. *et al.* The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, v. 11, n. 1, p. 337–348, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930>>. Citado na página 18.
- Cochrane, C. *et al.* New design of textile light diffusers for photodynamic therapy. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 3, p. 1170–1175, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112005644>>. Citado na página 25.
- Costerton, J. W. *et al.* Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 711–745, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>>. Citado na página 18.
- Delaney, C. D. *Investigating the Interactions Between Candida albicans Biofilms and Antifungal Agents*. Tese (Doutorado) — University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom, 2021. Disponível em: <<https://theses.gla.ac.uk/id/eprint/82245>>. Citado na página 48.
- Denning, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, Elsevier, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)>. Citado na página 27.
- Dias, J. do N. *et al.* Synergic effect of the antimicrobial peptide toap2 and fluconazole on *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, Basel, Switzerland, v. 25, n. 14, p. 1–13, 07 2024. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/25/14/7769>>. Citado na página 43.
- Dias, J. do N. *et al.* Mechanisms of action of antimicrobial peptides toap2 and ndbp-5.7 against candida albicans planktonic and biofilm cells. *Scientific Reports*, v. 10, p. 10327, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67041-2>>. Citado 2 vezes nas páginas 47 e 52.
- Dijk, P. V. *et al.* Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, Microbial Cell, v. 5, n. 7, p. 300–326, 2018. ISSN 2317-5960. Disponível em: <<https://doi.org/10.15698/mic2018.07.638>>. Citado na página 62.
- Dougherty, T. J. Photodynamic therapy. In: _____. *Endoscopic Laser Surgery Handbook*. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987. p. 29. ISBN 9781003065753. Disponível em: <<https://doi.org/10.1201/9781003065753>>. Citado na página 19.
- Dougherty, T. J.; Marcus, S. L. Photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*, v. 28, n. 10, p. 1734–1742, 1992. ISSN 0959-8049. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095980499290080L>>. Citado na página 20.

- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002. PMID: 11773609. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>>. Citado na página 21.
- Dunn, M. *et al.* Automated quantification of candida albicans biofilm-related phenotypes reveals additive contributions to biofilm production. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 6, p. 36, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41522-020-00149-5>>. Citado na página 54.
- Fabio, G. B. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy and the advances impacted by the association with nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, v. 80, p. 104147, 2023. ISSN 1773-2247. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224722010589>>. Citado na página 60.
- Filipić, B. *et al.* Evaluation of novel compounds as anti-bacterial or anti-virulence agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 14, 2024. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2024.1370062>>. Citado 2 vezes nas páginas 50 e 58.
- Fisher, M. C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 557–571, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>>. Citado na página 19.
- Foote, C. S. Free radicals in biology. In: _____. New York, NY, USA: Academic Press, 1976. v. 2, cap. Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems, p. 85–133. ISBN 9780323156103. Citado na página 20.
- Foote, C. S. Definition of type i and type ii photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, v. 54, n. 5, p. 659–659, 1991. Citado na página 20.
- Fridovich, I. Mitocôndrias: são elas a sede da senescência? *Aging Cell*, v. 3, p. 13–16, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00075.x>>. Citado na página 21.
- Gao, Y. *et al.* The progress and future of the treatment of *Candida albicans* infections based on nanotechnology. *J Nanobiotechnol*, v. 22, p. 568, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-024-02841-6>>. Citado na página 27.
- Gomer, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 54, n. 6, p. 1093–1107, 1991. Citado na página 22.
- Gonzales, F. P.; Maisch, T. Photodynamic inactivation for controlling candida albicans infections. *Fungal Biology*, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614611001814>>. Citado na página 26.
- Grieneisen, M. L.; Zhang, M. Nanoscience and nanotechnology: Evolving definitions and growing footprint on the scientific landscape. *Small*, Wiley-VCH Verlag, v. 7, n. 20, p. 2836–2839, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/smll.201100387>>. Citado na página 23.

- Gulati, M.; Nobile, C. J. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 5, p. 310–321, 2016. ISSN 1286-4579. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457916000095>>. Citado na página 53.
- Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. Photodynamic therapy—current limitations and novel approaches. *Frontiers in Chemistry*, Frontiers, v. 9, 2021. ISSN 2296-2646. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2021.691697>>. Citado na página 61.
- Gutierrez, J. K. T. *et al.* Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy. *PLOS ONE*, Public Library of Science (PLOS), San Francisco, CA, USA, v. 12, n. 11, p. e0187418, 11 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187418>>. Citado na página 60.
- Gutzmann, D. J. *et al.* The role of serum albumin in candida albicans filamentation, germ tube formation, and farnesol sequestration. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 0, p. e01626–24, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.01626-24>>. Citado na página 48.
- Hamblin, M. R.; Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical Photobiological Sciences*, v. 3, n. 5, p. 436, 05 2004. Citado na página 21.
- Herman, T. *et al.* Resazurin to determine the minimum inhibitory concentration on antifungal susceptibility assays for *fonsecaea* sp. using a modified eucast protocol. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 55, p. 1349–1357, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01293-2>>. Citado 2 vezes nas páginas 57 e 58.
- Horne, T.; Cronjé, M. Mechanistics and photo-energetics of macrocycles and photodynamic therapy: An overview of aspects to consider for research. *Chemistry Biology Drug Design*, v. 89, p. 221–242, 2017. Citado na página 22.
- Huang, Y.-Y. *et al.* Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy? *Nanotechnology Reviews*, De Gruyter, v. 1, n. 2, p. 111–146, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/ntrev-2011-0005>>. Citado na página 23.
- Hube, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of candida albicans. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 336–341, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527404000694>>. Citado na página 18.
- Jacobsen, I. D. The role of host and fungal factors in the commensal-to-pathogen transition of candida albicans. *Current Clinical Microbiology Reports*, v. 10, p. 55–65, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40588-023-00190-w>>. Citado na página 18.
- Jia, X.; Jia, L. Nanoparticles improve biological functions of phthalocyanine photosensitizers used for photodynamic therapy. *Current Drug Metabolism*, v. 13, n. 8, p. 1119–1122, 2012. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2012/00000013/00000008/art00009>>. Citado na página 23.

Johnson, C. *et al.* The extracellular matrix of candida albicans biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLOS Pathogens*, v. 12, n. 9, p. e1005884, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005884>>. Citado na página 19.

Junqueira, J. C. *et al.* Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29h, 31h-phthalocyanine (znpc). *Lasers in Medical Science*, Springer, London, UK, v. 27, n. 6, p. 1205–1212, 12 2012. ISSN 0268-8921. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-012-1050-2>>. Citado na página 58.

Kaneko, Y. *et al.* Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, v. 57, n. 5, p. 2226–2230, 05 2013. ISSN 0066-4804. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.02290-12>>. Citado na página 46.

Kaur, J.; Nobile, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, Elsevier, v. 71, p. 102237, 2023. ISSN 1369-5274. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527422001217>>. Citado na página 52.

Kim, M. M.; Darafsheh, A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy†. *Photochemistry and Photobiology*, v. 96, p. 280–294, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/php.13219>>. Citado na página 25.

Kojic, E.; Darouiche, R. Candida infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 2, p. 255–267, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.255-267.2004>>. Citado na página 19.

Kumamoto, C. A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 386–391, 2011. ISSN 1369-5274. Host–microbe interactions: fungi/parasites/viruses. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411000993>>. Citado na página 17.

Kwiatkowski, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine Pharmacotherapy*, v. 106, p. 1098–1107, 2018. ISSN 0753-3322. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218341611>>. Citado na página 20.

Lamsal, S. *et al.* Antifungal susceptibility and biofilm formation of candida albicans isolated from different clinical specimens. *Tribhuvan University Journal of Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 53–62, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3126/tujm.v8i1.41195>>. Citado na página 56.

Landau, J. W.; Dabrowa, N.; Newcomer, V. D. The rapid formation in serum of filaments by *Candida albicans*. *The Journal of Investigative Dermatology*, Elsevier, U.S.A., v. 44, n. 3, p. 171–179, 1965. Citado na página 48.

Lee, Y. *et al.* Antifungal drug resistance: Molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*, American Chemical Society, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 03 2021. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>>. Citado na página 52.

- Li, X. *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 379, p. 147–160, 2019. ISSN 0010-8545. Novel and Smart Photosensitizers from Molecule to Nanoparticle. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001085451730334X>>. Citado na página 22.
- Liu, Y. *et al.* Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, 2019. ISSN 1460-4744. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c7cs00807d>>. Citado na página 60.
- Lohse, M. *et al.* Development and regulation of single- and multi-species candida albicans biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, p. 19–31, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>>. Citado na página 19.
- Macias-Paz, I. U. *et al.* *Candida albicans*, the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 55, n. 2, p. 189–198, 2023. ISSN 0325-7541. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754122000840>>. Citado na página 17.
- Mantareva, V. *et al.* Photodynamic efficacy of water-soluble si(iv) and ge(iv) phthalocyanines towards candida albicans planktonic and biofilm cultures. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 4430–4440, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523411005289>>. Citado na página 56.
- Mantareva, V. *et al.* Non-aggregated ga(iii)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochemical Photobiological Sciences*, Springer, v. 10, p. 91–102, 2011. ISSN 1474-9092. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/b9pp00154a>>. Citado na página 61.
- Marcos-Zambrano, L. J. *et al.* Biofilm production and antibiofilm activity of echinocandins and liposomal amphotericin b in echinocandin-resistant yeast species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.03065-15>>. Citado na página 52.
- Mason, T. G. *et al.* Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, IOP Publishing, v. 18, n. 41, p. R635–R666, sep 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>>. Citado na página 24.
- Mathé, L.; Dijck, P. V. Recent insights into candida albicans biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, v. 59, n. 4, p. 251–264, 11 2013. ISSN 1432-0983. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>>. Citado na página 45.
- McCoy, C. *et al.* Photodynamic antimicrobial polymers for infection control. *PLOS ONE*, v. 9, n. 9, p. e108500, 2014. Citado na página 26.
- McManus, B. A.; Coleman, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 166–178, 2014. ISSN 1567-1348. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134813004206>>. Citado na página 17.

- Mitchell, A. P. Dimorphism and virulence in candida albicans. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, n. 6, p. 687–692, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527498801161>>. Citado na página 18.
- Moghassemi, S. *et al.* Nanoemulsion applications in photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, v. 351, p. 164–173, 2022. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365922006307>>. Citado na página 24.
- Moraes, M. de *et al.* Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 12, n. 4, p. 592–597, 2015. ISSN 1572-1000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100015300417>>. Citado na página 62.
- Morais, J. A. V. *et al.* Direct and abscopal antitumor responses elicited by alpcne-mediated photodynamic therapy in a murine melanoma model. *Pharmaceutics*, MDPI, Basel, Switzerland, v. 16, n. 9, p. 1177, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091177>>. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 60.
- Muehlmann, L. *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma mcf-7 cells. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, p. 36, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-015-0095-3>>. Citado na página 24.
- Nett, J.; Andes, D. Contributions of the biofilm matrix to candida pathogenesis. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 1, p. 21, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof6010021>>. Citado na página 27.
- Nickerson, K. W. *et al.* Physiological adventures in candida albicans: farnesol and ubiquinones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 88, p. e00081–22, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mmbr.00081-22>>. Citado na página 48.
- Nobile, C. J.; Johnson, A. D. Candida albicans biofilms and human disease. *Annual Review of Microbiology*, Annual Reviews, v. 69, n. Volume 69, 2015, p. 71–92, 2015. ISSN 1545-3251. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-micro-091014-104330>>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 55.
- Nunes, L. C. *Efeitos de drogas epigenéticas combinadas com terapia fotodinâmica sobre o crescimento de fungos filamentosos, Candida albicans e Candida parapsilosis*. 75 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Brasília, Brasília, 2023. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Citado 2 vezes nas páginas 42 e 56.
- Odds, F. C. Candida infections: An overview. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 1–5, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/10408418709104444>>. Citado na página 17.
- Pavoni, L. *et al.* Properties and stability of nanoemulsions: How relevant is the type of surfactant? *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 58, p. 101772, 2020. ISSN 1773-2247. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224720302768>>. Citado na página 62.

Perumal, P.; Mekala, S.; Chaffin, W. L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 7, p. 2454–2463, 2007. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.01237-06>>. Citado na página 47.

Pham, T. C. *et al.* Recent strategies to develop innovative photosensitizers for enhanced photodynamic therapy. *Chemical Reviews*, American Chemical Society, v. 121, n. 21, p. 13454–13619, 11 2021. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00381>>. Citado na página 22.

Pierce, C. G. *et al.* A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, Journal of Visualized Experiments, v. 44, p. 2287, 2010. ISSN 1940-087X. Disponível em: <<https://doi.org/10.3791/2287>>. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 47.

Pinto, S. M. L. *et al.* Nanoemulsions with chloroaluminium phthalocyanine and paromomycin for combined photodynamic and antibiotic therapy for cutaneous leishmaniasis. *Infection Chemotherapy*, The Korean Society of Infectious Diseases and Korean Society for Chemotherapy, Seoul, Korea, v. 53, n. 2, p. 342–354, Jun 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3947/ic.2021.0010>>. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 62.

Qian, W. *et al.* Antifungal and antibiofilm efficacy of paeonol treatment against biofilms comprising candida albicans and/or cryptococcus neoformans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 2022. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2022.884793>>. Citado na página 52.

Rak, J. *et al.* Drug delivery systems for phthalocyanines for photodynamic therapy. *Anticancer Research*, International Institute of Anticancer Research, v. 39, n. 7, p. 3323–3339, 2019. ISSN 0250-7005. Disponível em: <<https://ar.iijournals.org/content/39/7/3323>>. Citado na página 23.

Rakhmatulina, M. R.; Lipova, E. V.; Nyanenko, V. A. Pathogenetic aspects and modern possibilities of therapy of urogenital candidiasis (literature review). *Vestnik dermatologii i venerologii*, v. 100, n. 6, 2024. ISSN 0042-4609. Disponível em: <<https://vestnikdv.ru/jour/article/view/16820>>. Citado na página 45.

Ramage, G. *et al.* Inhibition of candida albicans biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 5459–5463, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5459-5463.2002>>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 48.

Ramage, G. *et al.* Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 9, p. 2475–2479, 2001. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.45.9.2475-2479.2001>>. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 50.

Ranjan, K. *et al.* Antifungal efficacy of photodynamic therapy on cryptococcus and candida species is enhanced by streptomyces spp. extracts in vitro. *Lasers in Medical Science*, Springer, v. 39, p. 255, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-024-04204-x>>. Citado na página 24.

Repp, K. K.; Menor, S. A.; Pettit, R. K. Microplate alamar blue assay for susceptibility testing of candida albicans biofilms. *Medical Mycology*, v. 45, n. 7, p. 603–607, November 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13693780701581458>>. Citado na página 50.

Revie, N. M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*, v. 45, p. 70–76, 2018. ISSN 1369-5274. Antimicrobials * Microbial systems biology. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527417300875>>. Citado na página 19.

Ribeiro, A. P. D. *et al.* Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochemistry and Photobiology*, Wiley, Hoboken, NJ, USA, v. 89, n. 1, p. 111–119, 01 2012. ISSN 0031-8655. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01198.x>>. Citado na página 58.

Rodrigues, G. B. *et al.* Photodynamic inactivation of candida albicans and candida tropicalis with aluminum phthalocyanine chloride nanoemulsion. *Fungal Biology*, v. 124, n. 5, p. 297–303, 2020. ISSN 1878-6146. Fungal Adaption to Stress. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614619301072>>. Citado na página 56.

Rodrigues, G. B. *et al.* In vitro photodynamic inactivation of cryptococcus neoformans melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. *Photochemistry and Photobiology*, v. 88, n. 2, p. 440–447, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01055.x>>. Citado na página 56.

Ron, A. R.; Moghissi, K. Photodynamic therapy (pdt): Pdt mechanisms. *ce*, v. 46, n. 1, p. 24–29, 2013. Disponível em: <<http://www.e-sciencecentral.org/articles/?scid=1151798>>. Citado na página 19.

Rossetti, F. C. *et al.* A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, v. 155, n. 3, p. 400–408, 2011. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911004482>>. Citado na página 23.

Ruiz-Herrera, J. *et al.* Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research*, Oxford University Press, Oxford, UK, v. 6, n. 1, p. 14–29, 01 2006. ISSN 1567-1364. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x>>. Citado na página 60.

Sachivkina, N.; Podoprigora, I.; Bokov, D. Morphological characteristics of candida albicans, candida krusei, candida guilliermondii, and candida glabrata biofilms, and response to farnesol. *Veterinary World*, v. 14, n. 6, p. 1608–1614, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1608-1614>>. Citado na página 48.

Sakima, V. T. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy mediated by curcumin-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of oral candidiasis. *Molecules*, MDPI, Basel, Switzerland, v. 23, n. 8, p. 2075, 08 2018. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules23082075>>. Citado na página 60.

- Samaranayake, L.; MacFarlane, T. The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin in vitro. *Archives of Oral Biology*, v. 26, n. 10, p. 815–820, 1981. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996981901783>>. Citado na página 18.
- Samaranayake, Y. H. *et al.* Human serum promotes *Candida albicans* biofilm growth and virulence gene expression on silicone biomaterial. *PLOS ONE*, Public Library of Science, v. 8, n. 5, p. 1–12, 05 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062902>>. Citado na página 48.
- Santos, K. L. M. *et al.* Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 32, p. 102032, 2020. ISSN 1572-1000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100020303860>>. Citado na página 23.
- Scorzoni, L. *et al.* Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, v. 123, p. 68–78, 2016. ISSN 0167-7012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701216300227>>. Citado na página 51.
- Singh, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, v. 252, p. 28–49, 2017. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365917301128>>. Citado na página 24.
- Siqueira, L. B. d. O. de *et al.* Pharmaceutical nanotechnology applied to phthalocyanines for the promotion of antimicrobial photodynamic therapy: A literature review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 39, p. 102896, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157210002200182X>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 56.
- Slutsky, B. *et al.* "white-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, v. 169, p. 189–197, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.169.1.189-197.1987>>. Citado na página 18.
- Soares, J. C. M. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue-loaded polymeric micelles against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, v. 41, p. 103285, 2023. ISSN 1572-1000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100023000145>>. Citado na página 60.
- Souza, S. O. *et al.* Fotoativação de comunidades de leveduras e biofilmes de *Candida albicans* mediada por zntnhex-2-pyp⁴⁺ porfirina. *Jornal de Fungos*, v. 8, n. 6, p. 556, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof8060556>>. Citado na página 58.
- Souza-Silva, C. M. de *et al.* Broth microdilution in vitro screening: An easy and fast method to detect new antifungal compounds. *Journal of Visualized Experiments*, Journal of Visualized Experiments, United States, v. 132, p. 57127, Feb 2018. ISSN 1940-087X. Research Support, Non-U.S. Gov't. Disponível em: <<https://doi.org/10.3791/57127>>. Citado na página 31.

- Stokes, C. *et al.* Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 44, n. 9, p. 920–931, 2007. ISSN 1087-1845. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184506002209>>. Citado na página 18.
- Sudbery, P. E. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Molecular Microbiology*, v. 41, p. 19–31, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02459.x>>. Citado na página 17.
- Tappeiner, H. von; Jodlbauer, A. *Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen: gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*. Leipzig, Germany: Vogel, 1907. Citado na página 19.
- Tegos, G. *et al.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2012.00120>>. Citado na página 20.
- Tsui, C.; Kong, E. F.; Jabra-Rizk, M. A. Pathogenesis of candida albicans biofilm. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 4, p. ftw018, 03 2016. ISSN 2049-632X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>>. Citado na página 46.
- Uwamahoro, N. *et al.* The pathogen candida albicans hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *mBio*, v. 5, p. e00003–14, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mbio.00003-14>>. Citado na página 18.
- Vatansever, F. *et al.* Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 6, p. 955–989, 11 2013. Citado na página 22.
- Vediyappan, G.; Rossignol, T.; d’Enfert, C. Interaction of candida albicans biofilms with antifungals: Transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aac.01638-09>>. Citado na página 53.
- Vincent, B. M. *et al.* Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin b. *PLOS Biology*, Public Library of Science, v. 11, n. 10, p. 1–17, 10 2013. ISSN 1545-7885. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001692>>. Citado na página 52.
- Wainwright, M.; Crossley, K. B. Photosensitising agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *International Biodeterioration Biodegradation*, v. 53, n. 2, p. 119–126, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830503001641>>. Citado na página 26.
- Wainwright, M. *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *The Lancet Infectious Diseases*, Elsevier, v. 17, n. 2, p. e49–e55, 2017. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7)>. Citado na página 25.

Wall, G. *et al.* Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, Elsevier, v. 52, p. 1–6, 2019. ISSN 1369-5274. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527418300973>>. Citado na página 45.

Wilson, B. C. Photodynamic therapy: Light delivery and dosage for second-generation photosensitizers. In: _____. *Ciba Foundation Symposium 146 - Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Citado por Kim, M.M. and Darafsheh, A. (2020), Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*, 96: 280–294. <https://doi.org/10.1111/php.13219>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9780470513842.ch5>>. Citado na página 25.

Wilson, B. C.; Patterson, M. S. The physics of photodynamic therapy. *Physics in Medicine Biology*, v. 31, n. 4, p. 327, apr 1986. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/31/4/001>>. Citado na página 25.

Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 10, p. 95–105, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>>. Citado na página 19.

Yawata, Y. *et al.* Microfluidic studies of biofilm formation in dynamic environments. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology, v. 198, 2016. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.00118-16>>. Citado na página 62.

Zarnowski, R. *et al.* Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio*, v. 5, 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mbio.01333-14>>. Citado na página 53.

Zhao, X. *et al.* Candida albicans als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 152, n. 8, p. 2287–2299, 2006. ISSN 1465-2080. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28959-0>>. Citado na página 48.

Zhou, C. *et al.* Mitochondria-specific aggregation-induced emission luminogens for selective photodynamic killing of fungi and efficacious treatment of keratitis. *ACS Nano*, American Chemical Society, v. 15, n. 7, p. 12129–12139, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c03508>>. Citado na página 56.

Zhu, T. C.; Finlay, J. C.; Wilson, B. C. *Photodynamic Therapy: Fundamentals and Dosimetry*. Philadelphia, PA; Toronto, CA: Dept. of Radiation Oncology, University of Pennsylvania, and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 2005. AAPM Refresher Course (July 28, 2005). Disponível em: <<https://www.aapm.org/meetings/05AM/pdf/18-2686-77248-179.pdf>>. Citado na página 25.