



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

GABRIELA VIEIRA MENDES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA CARREADOR DE AZUL
DE METILENO EM *GELLAN GUM* PARA APLICAÇÃO NA
TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA CONTRA
*Candida albicans***

2023

GABRIELA VIEIRA MENDES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA CARREADOR DE AZUL DE METILENO
EM *GELLAN GUM* PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Mendes, Gabriela Vieira

Desenvolvimento de um sistema carreador de azul de metileno em gellan gum para aplicação na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *Candida albicans* / Gabriela Vieira Mendes. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Hidrogéis. 3. Azul de metileno. 4. Biofilmes. 5. *Candida albicans*. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa tem como potencial impacto científico o desenvolvimento de um sistema carreador de fotossensibilizador azul de metileno para uso na terapia fotodinâmica no tratamento da candidíase. A inovação consiste no emprego de um hidrogel à base de *gellan gum* que possibilita maior tempo de contato do fotossensibilizador com os tecidos durante a irradiação de luz e, conseqüentemente, a potencialização dos efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica. O produto final tem inserção em nível nacional, pois é compatível com fontes de luz disponíveis em clínicas odontológicas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The potential scientific impact of this research is the development of a methylene blue photosensitizer carrier system for use in photodynamic therapy in the treatment of candidiasis. The innovation consists in the use of a hydrogel based on gellan gum that allows for a longer contact time between the photosensitizer and the tissues during light irradiation and, consequently, the potentiation of the antimicrobial effects of photodynamic therapy. The final product has insertion at a national level, as it is compatible with light sources available in dental clinics.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo

Faculdade São Leopoldo Mandic

Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic

Campus Campinas

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 17 de Março de 2023.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Teresa** e **Gilberto**, que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos. Grata pelo amor, paciência e companhia em todos os momentos. Vocês são a minha base. Dedico a conclusão desta etapa a vocês!

Ao meu irmão **Tiago**, obrigada pelas conversas e momentos de descontração, você me ajudou a tomar decisões que me trouxeram até aqui. Saiba que você é meu exemplo e inspiração desde pequena!

Aos meus avós **Heloisa** (*in memorian*), **José Vieira** (*in memorian*), **Pilar** e **Hiroyoshi**, obrigada pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo. Vocês proporcionaram momentos inesquecíveis que me tornaram o que sou hoje! Saibam que vocês foram essenciais nesta jornada!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira** pela confiança, disponibilidade, paciência e incentivo no decorrer deste trabalho. Cada reunião, correção e aula foram novos aprendizados. Obrigada por compartilhar o conhecimento e experiência!

À Banca Examinadora **Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo** e **Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira** pela participação, contribuições e discussões neste trabalho!

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos pela infraestrutura e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicada a Saúde Bucal e Corpo Docente** por todo aprendizado, auxílio e incentivo oferecido.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pela bolsa concedida.

À **Dra. Anita Shukla** do Centro de Engenharia Biomédica da Brown University e ao **Office of Naval Research Global (ONR/EUA)** pela colaboração e financiamento desse projeto (N62909-20-1-2034).

Aos funcionários da **Seção Técnica de Pós-graduação** por toda a paciência e auxílio dado, principalmente em época de distanciamento social pela pandemia. Vocês foram muito atenciosos!

À equipe da **Biblioteca** pelo auxílio durante minha jornada e elaboração do trabalho por meio da disponibilidade de material bibliográfico e orientações das normas.

A minha *Family*, **Maurício, Mara, Isa, Heleninha e Renato** obrigada pelo apoio e incentivo em todos os momentos!

A minha cunhada **Gabriela Sapucci** pelo exemplo de pessoa e profissional, obrigada pelo carinho e conselhos!

Às amigas formadas no laboratório da UNESP, **Maíra Terra, Amanda Rehem, Paulo Fonseca, Livia Godoi, Evelyn Santos, Juliana Gonçale, Maria Fernanda e Patrícia Nagai**, obrigada pela troca de conhecimento e convívio diário! Vocês são ótimas pessoas e desejo a todos muito sucesso!

Aos meus amigos em especial, **Lais Silva, Letícia Kito, Maíra Terra, Amanda Rehem, Paulo Fonseca e Mariana Dias**, obrigada pela amizade, risadas, conversas e momentos de descontração. Contem sempre comigo!

Aos meus colegas do **Sabin Medicina Diagnóstica**, muito obrigada pela recepção, aprendizado, incentivo e convívio diário!

A todos meus amigos e familiares que me acompanharam nesta etapa e estão comigo no dia a dia me alegrando!

“Todos os nossos sonhos podem se realizar, se tivermos a coragem de persegui-los”

Walt Disney

RESUMO

Mendes GV. Desenvolvimento de um sistema carreador de azul de metileno em *gellan gum* para aplicação na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *Candida albicans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) é uma reação fotoquímica capaz de inativar microrganismos por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo considerada uma possível alternativa para o tratamento da candidose bucal. Até o momento, os fotossensibilizadores têm sido utilizados majoritariamente sob a forma aquosa, o que reduz o tempo de contato com a superfície do corpo e dificulta seu uso na mucosa bucal. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema carreador de azul de metileno no hidrogel de goma gelana (*gellan gum*), avaliando-se suas propriedades fotodinâmicas e antifúngicas contra *Candida albicans*. Para o desenvolvimento do sistema carreador, o azul de metileno foi incorporado em *gellan gum* de concentrações 0,6% e 1,0% (m/v) e sua taxa de liberação determinada em função do tempo. As propriedades fotodinâmicas foram avaliadas por varredura no espectro do UV-visível e estudo de formação de escudo óptico nos hidrogéis. Para o estudo da atividade antifúngica do sistema carreador, a TFD (LED de 664 nm, densidade de energia de 30,56 J/cm², densidade de potência de 42,8 mW/cm² e tempo de 714 seg) foi aplicada sobre *C. albicans* (ATCC18804) em culturas planctônica e biofilme. Os efeitos da TFD em cultura planctônica e biofilme foram avaliados por contagem de células viáveis em UFC/mL e submetidos à análise estatística por Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Como resultados obtidos, verificou-se que 100% do azul de metileno foi liberado no meio reacional pelo hidrogel na concentração 0,6% (m/v) decorrido 12 min, enquanto o *gellan gum* de 1,0% (m/v) liberou 75% do fotossensibilizador após 25 min. A varredura no UV-visível detectou pico de absorção em comprimento de onda em 660 nm para ambos os hidrogéis de 0,6% (m/v) e 1,0% (m/v) contendo o fotossensibilizador. Não foi observada formação de escudo óptico por ambas as formulações em *gellan gum* quando comparados com a forma aquosa do azul de metileno. A aplicação da TFD com azul de metileno em *gellan gum* sobre culturas planctônicas resultou na redução total e significativa das células de *C. albicans*. No estudo em biofilmes, a redução microbiana significativa alcançada pela TFD, utilizando-se o azul de metileno carreado em *gellan gum*, foi de aproximadamente 1 log (UFC/mL). Conclui-se que o sistema de *gellan gum* como carreador de azul de metileno foi capaz de manter as propriedades ópticas, de liberação e fotoinativação sobre cultura planctônica e biofilme maduro de *Candida albicans*.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; hidrogéis; azul de metileno; biofilmes; *Candida albicans*; *Gellan gum*.

ABSTRACT

Mendes GV. Development of a methylene blue carrier system in gellan gum for application in antimicrobial photodynamic therapy against *Candida albicans* [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Antimicrobial photodynamic therapy (PDT) is a photochemical reaction capable of inactivating microorganisms through the production of reactive oxygen species (ROS) and is considered a possible alternative for the treatment of oral candidiasis. So far, photosensitizers have been used mostly in aqueous form, which reduces the time of contact with the body surface and makes their use difficult on the oral mucosa. Thus, the aim of this study was to develop a methylene blue carrier system in hydrogel based gellan gum evaluating its photodynamic and antifungal properties against *Candida albicans*. For the development of the carrier system, methylene blue was incorporated into gellan gum at concentrations of 0.6% and 1.0% (w/v) and its release rate determined as a function of time. The photodynamic properties were evaluated by scanning the UV-visible spectrum and studying the formation of an optical shield in the hydrogels. To study the antifungal activity of the carrier system, PDT (664 nm LED, energy density of 30.56 J/cm², power density of 42.8 mW/cm² and time of 714 sec) was applied on *C. albicans* (ATCC18804) in planktonic and biofilm cultures. The effects of PDT on planktonic culture and biofilm were evaluated by counting viable cells in CFU/mL and submitted to statistical analysis by Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's post-test with a significance level of 5%. As results obtained, it was verified that 100% of the photosensitizer was released in the reaction medium by the hydrogel in the concentration 0.6% (w/v) after 12 min., while the gellan gum of 1.0% (m/v) released 75% of the photosensitizer after 25 min. UV-visible scanning detected peak absorption at wavelength at 660 nm for both 0.6% (m/v) and 1.0% (m/v) hydrogels containing the photosensitizer. Optical shield formation was not observed by both formulations when compared to the aqueous form. The application of PDT with methylene blue in gellan gum on planktonic cultures resulted in the significative total reduction of *C. albicans* cells. In the study on biofilms, the significative microbial reduction achieved by PDT, using carrier systems, was approximately 1 log (CFU/mL). It is concluded that the gellan gum system as methylene blue carrier was able to maintain the optical, release and photoinactivation properties on planktonic culture and mature biofilm of *C. albicans*.

Keywords: photodynamic therapy; hydrogels; methylene blue; biofilms; *Candida albicans*; Gellan gum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Terapia Fotodinâmica.....	16
2.2 Sistemas de entrega de fotossensibilizadores	19
2.3 <i>Candida albicans</i> e candidose bucal	21
3 PROPOSIÇÃO	25
3.1 Objetivos gerais.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Preparo da solução de azul de metileno (AM)	26
4.2 Incorporação do azul de metileno no hidrogel de <i>gellan gum</i>	26
4.3 Teste de liberação do azul de metileno	27
4.4 Caracterização do sistema carreador de azul de metileno em <i>gellan gum</i> de acordo com as propriedades fotodinâmicas	28
4.4.1 Espectroscopia de absorção na região UV-Visível.....	28
4.4.2 Teste do escudo óptico.....	28
4.5 Efeitos do sistema carreador de azul de metileno em <i>gellan gum</i> na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra <i>C. albicans</i>	29
4.5.1 Ativação dos microrganismos	29
4.5.2 Fonte de luz.....	29
4.5.3 Grupos experimentais.....	30
4.5.4 Terapia fotodinâmica em células planctônicas de <i>C. albicans</i>	30
4.5.5 Terapia fotodinâmica em biofilme.....	31
4.6 Análise estatística	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Teste de liberação do azul de metileno	34
5.2 Espectroscopia de absorção na região UV-Visível.....	36
5.3 Escudo óptico.....	38
5.4 Efeitos do sistema carreador de azul de metileno em <i>gellan gum</i> na terapia fotodinâmica contra <i>C. albicans</i>	40

5.4.1 Terapia fotodinâmica em cultura planctônica.....	40
5.4.2 Terapia fotodinâmica em biofilme.....	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) (do inglês Photodynamic Therapy - PDT) é definida como uma reação fotoquímica, não-invasiva e dependente de oxigênio capaz de destruir células por processo de necrose ou apoptose, além de induzir dano celular e morte de microrganismos (Carrera et al., 2016; Dascalu Rusu et al., 2020). O seu mecanismo de ação ocorre por meio de uma fonte de luz em comprimento de onda específico capaz de ativar o fotossensibilizador, que na presença de oxigênio, gera resposta fototóxica (Carrera et al., 2016). A ação fototóxica é viabilizada devido ao fotossensibilizador no estado singleto excitado migrar para a forma tripleto excitado, que é capaz de interagir com moléculas de oxigênio do ambiente por meio dos mecanismos de tipo I e tipo II (Ribeiro et al., 2007).

O mecanismo do tipo I ocorre devido à transferência de elétrons do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o oxigênio ambiente, resultando na formação de peróxido de hidrogênio e radicais livres, como superóxido e hidroxila (Ribeiro et al., 2007). Estas espécies de oxigênio são capazes de alterar estruturas da membrana celular e DNA, além de induzirem ao processo de morte celular por mecanismos de inibição enzimática, peroxidação lipídica e aglutinação de proteínas essenciais (Carrera et al., 2016). O mecanismo do tipo II resulta na produção de oxigênio singleto excitado por meio da transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio. Esta espécie de oxigênio apresenta elevada reatividade e é capaz de atuar em lipídeos insaturados, aminoácidos e ácido nucleicos das células-alvo (Ribeiro et al., 2007).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) tornou-se um método alternativo frente ao advento da resistência aos antimicrobianos, uma vez que os agentes oxidativos atuam de forma inespecífica sobre os microrganismos, impedindo o desenvolvimento de cepas resistentes à terapia (Wiench et al., 2021). Para tanto, a eficácia dessa terapia depende da relação compatível entre microrganismos, tipos de fotossensibilizadores, fontes de luz e condições de irradiação (Carrera et al., 2016). De forma geral, os fotossensibilizadores devem apresentar as seguintes características: alto grau de pureza química, estabilidade em temperatura ambiente, mínima citotoxicidade no escuro, efeito fotossensível em comprimento de onda

específico e alta solubilidade em tecidos. Desse modo, vários fotossensibilizadores foram desenvolvidos ao longo dos anos. Na década de 70, a hematoporfirina (HpD) e derivados foram os primeiros fotossensibilizadores utilizados em escala comercial (Kwiatkowski et al., 2018). Apesar do seu amplo uso na terapia fotodinâmica para tratamento de cânceres, a hematoporfirina, tem demonstrado algumas limitações, como impureza química, baixa penetração nos tecidos, toxicidade para pele e intenso acúmulo em tecidos saudáveis (Baskaran et al., 2018).

Posteriormente, diversas substâncias em potencial foram estudadas para uso como fotossensibilizador, dentre elas estão as clorinas e as ftalocianinas, além de compostos não porfirinóides como as cianinas e fenotiazinas (Lucky et al., 2015). Em comparação aos primeiros fotossensibilizadores utilizados clinicamente, estes grupos demonstraram melhor desempenho quanto a seletividade, penetração em tecidos, fotossensibilidade e maior produção de espécies reativas de oxigênio (Wang et al., 2021).

Estudos demonstraram que os compostos fenotiazínicos são capazes de promover a fotoinativação de bactérias Gram-positivas e negativas devido a sua estrutura molecular naturalmente catiônica (Jori et al., 2006). Estes compostos apresentam espectro de absorção entre 600 e 660 nm, o que permite eficiente penetração da luz nos tecidos (Simplicio et al., 2002). Dois corantes conhecidos da classe dos fenotiazínicos são o azul de metileno e o azul de toluidina O (TBO), que além do uso como fotossensibilizadores, também são utilizados como corantes histológicos (Tardivo et al., 2005; Wiench et al., 2021). Entre todos os fotossensibilizadores desenvolvidos, o azul de metileno (AM) é um dos mais utilizados na terapia fotodinâmica antimicrobiana, sendo aprovado para uso clínico em vários países, como o Brasil (Garcez et al., 2011; Tardivo et al., 2005).

Além do custo acessível, o azul de metileno apresenta espectro de absorção entre 620 e 660 nm, sendo compatível com lasers de baixa potência e LEDs emissores de luz na faixa do vermelho visível, comumente presentes em clínicas de saúde (Schaeffer et al., 2019). Diante dessas vantagens, o azul de metileno tem sido muito utilizado nas áreas médicas e odontológica para o tratamento de infecções localizadas causadas por bactérias, fungos, vírus e protozoários (Pinto et al., 2017; Schaeffer et al., 2019; Tardivo et al., 2005).

Entre as infecções fúngicas, a TFD tem sido bastante estudada como uma

possível terapia para a candidose bucal, uma infecção causada por leveduras do gênero *Candida*, como *Candida albicans*. A candidose é uma doença de alta prevalência na cavidade bucal, principalmente, em indivíduos com sistema imunológico debilitado, submetidos à antibioticoterapia prolongada ou portadores de próteses dentárias. Para causar infecção, *C. albicans* dispõe de vários fatores de virulência, como transição morfológica de leveduras para hifas, produção de enzimas histolíticas e formação de biofilmes. A capacidade de formar biofilmes dificulta o tratamento dessas infecções, pois em biofilmes as células de *Candida* são mais tolerantes aos agentes antifúngicos do que em crescimento planctônico. Além disso, o amplo uso de compostos antifúngicos, nas últimas décadas, para tratar as lesões de candidose, tem levado a seleção de cepas de *Candida* resistentes a esses medicamentos (Monika et al., 2017; Rodríguez-Cerdeira et al., 2020; Tortorano et al., 2021a).

Em virtude disso, a terapia fotodinâmica antimicrobiana é considerada como um tratamento alternativo potencial para a candidose bucal, visto que é pouco ou minimamente invasiva e seus produtos reativos atuam de forma inespecífica nas células alvo, eliminando-as e impedindo o desenvolvimento de resistência à terapia (Eduardo et al., 2015; Leung et al., 2020).

Buscando aumentar a eficácia da TFD, pesquisas recentes tem se voltado para o desenvolvimento de fotossensibilizadores mais solúveis e com maior especificidade nas células alvo (Lin et al., 2021). Nesse contexto, o uso de sistemas de entrega de medicamentos (*drug delivery system*) tem sido aplicado também à fotossensibilizadores, mostrando-se um recurso promissor para a aplicação da TFD em doenças infecciosas de interesse médico-odontológico. Nos sistemas de entrega, os fotossensibilizadores podem ser carregados em diferentes moléculas, como monossacarídeos, peptídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), nanopartículas inorgânicas ou orgânicas, e polímeros, como os hidrogéis (Mokwena et al., 2018).

O *gellan gum* é um exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea*, utilizado na indústria alimentícia como aditivo e gelificante alimentar. É considerado um biomaterial de baixo custo e com capacidade de produção em larga escala. Em 1992, seu uso na área biomédica foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Palumbo et al., 2020). Dentre as características de interesse, podem ser citadas a biocompatibilidade, baixa toxicidade e propriedade mucoadesiva

e ser termorresponsivo e biodegradável. Na literatura, tem sido utilizado na pesquisa como carreador de proteínas e fármacos, e na regeneração de ossos e feridas (Zia et al., 2018).

O hidrogel de *gellan gum* pode ser uma alternativa interessante como carreador para o azul de metileno, melhorando as condições locais da aplicação da TFD, o que pode favorecer o maior tempo de contato do fotossensibilizador com os tecidos, e consequente, maior penetração nas células microbianas. Até o nosso conhecimento, esse projeto é o primeiro a estudar o *gellan gum* como sistema de entrega de fotossensibilizador na TFD. O produto entregue por este projeto se encontra sob processo de patente e tem com objetivo a aplicação em clínicas médicas e odontológicas, viabilizando melhor aplicação e execução da terapia fotodinâmica em na cavidade bucal ou outras áreas do corpo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terapia Fotodinâmica

Diante de relatos e documentos históricos verificou-se o uso empírico da fototerapia para tratar doenças de pele em civilizações da China, Egito, Grécia e Índia (Verger et al., 2021; Youf et al., 2021). Em Málaga, no século XII, registros detalharam a importância da luz solar na fotossensibilização de drogas. No início do século XX, os pesquisadores Oscar Raab e Hermann von Tappeiner demonstraram a morte do protozoário *Paramecium caudatum* corado por acridina após exposição à luz (Youf et al., 2021). Em 1905, apesar de demonstrar resultados positivos no tratamento de células cancerígenas da pele, a terapia fotodinâmica não atraiu atenção da comunidade médica. Somente em 1975, Thomas Dougherty e colaboradores utilizaram o derivado da hematoporfirina (HpD) no tratamento de câncer de pele, resultando na produção e comercialização deste fotossensibilizador (Carobeli et al., 2021; Kwiatkowski et al., 2018). Desde então, a terapia fotodinâmica vem sendo utilizada clinicamente para tratamento de determinados tipos de câncer oral e de pele, e inativação de microrganismos, podendo ser considerada um procedimento minimamente invasivo (Youf et al., 2021; Younis et al., 2021).

O mecanismo de ação da TFD depende da interação entre oxigênio, fotossensibilizador e fonte emissora de luz em comprimento de onda específico. Após irradiação, o fotossensibilizado se torna excitado e é capaz de interagir com oxigênio ambiental ou endógeno da célula, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio das reações do tipo I e II (Chen et al., 2020). Ambos os mecanismos têm início com a absorção de um fóton pelo fotossensibilizador, estimulando-o do estado fundamental (S_0) para estado singlete excitado (S_1). No processo de decaimento, a molécula de fotossensibilizador excitada pode voltar ao estado fundamental por conversão interna resultando em fluorescência, ou por cruzamento intersistema, transformando-se em uma molécula estável no estado de tripleto excitado (T_1). Esta por sua vez pode retornar ao estado fundamental por fosforescência ou interagir com moléculas de oxigênio pelos mecanismos do tipo I ou

II associados à terapia fotodinâmica, devido à geração de espécies reativas de oxigênio que interagem com estruturas celulares (Drzewiecka-Matuszek, Rutkowska-Zbik, 2021; Lan et al., 2019; Wiench et al., 2021).

A reação do tipo I ocorre por meio da transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio do fotossensibilizador excitado para o oxigênio que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio (Junqueira et al., 2016; Tisoco et al., 2022). Estas espécies reativas são capazes de oxidar moléculas, como ácidos nucleicos, lipoproteínas e albumina, promovendo modificações estruturais de membranas e de materiais genéticos que induzem o processo de morte celular (Carrera et al., 2016; Tisoco et al., 2022). Especificamente, as membranas de composição lipídica podem sofrer formação de poros e rupturas devido à peroxidação lipídica (Vera et al., 2021).

Por meio da transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio, a reação do tipo II gera oxigênio singleto (1O_2) de elevada reatividade e citotóxico (Li et al., 2021). É uma molécula capaz de afetar as atividades enzimáticas envolvidas na glicólise e fermentação da célula alvo, além de modificar a porção residual de aminoácidos essenciais (Vera et al., 2021). A reação do tipo II é dependente de elevada quantidade de oxigênio, dessa forma, o processo deve ocorrer em microambientes com níveis de oxigênio normais, diferente do tipo I que é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio tanto em normóxia como hipóxia (Li et al., 2021; Xiao et al., 2022).

De forma geral, ambas as reações podem desencadear mecanismos diretos ou indiretos que são capazes de desestabilizar o funcionamento ideal da célula alvo (Hao et al., 2022; Verger et al., 2021). A ação direta da terapia fotodinâmica pode induzir necrose e apoptose devido ao estresse oxidativo celular em reação às espécies reativas de oxigênio. Já a ação indireta pode ser observada em tecidos tumorais por danos relacionados à ativação da resposta imunológica, mediadores inflamatórios e redução da vascularização tumoral (Verger et al., 2021).

Para aplicação segura e eficaz da terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador deve ser biocompatível para que seja facilmente degradado e eliminado pelo organismo após o processo de fotoativação (Zhou et al., 2021). É necessário apresentar mínima toxicidade no escuro, ação citotóxica quando fotoativado por comprimento de onda específico e deve apresentar absorção dentro da janela

terapêutica de aplicação (Carrera et al., 2016; Kwiatkowski et al., 2018). A fim de evitar excessiva fotossensibilização pela luz solar, também se recomenda absorção mínima na faixa de 400 a 600 nm (Kwiatkowski et al., 2018).

A fotossensibilização pode ser reduzida devido à capacidade de determinados tecidos apresentarem cromóforos, como a oxihemoglobina, os quais absorvem de forma endógena a luz que estaria integralmente disponível para o fotossensibilizador (Verger et al., 2021). Dessa forma, além de maior pureza, os pesquisadores buscaram desenvolver fotossensibilizadores com pico de absorção em comprimento de onda acima de 600 nm e na região do infravermelho próximo (NIR), característica a qual é compatível com penetração da luz em tecidos de maior profundidade e em comprimento de onda diferente de cromóforos presentes no organismo (Dereje et al., 2022; Tardivo et al., 2005). Em busca destas características, foram desenvolvidos os fotossensibilizadores de segunda geração ácido 5-aminolevulínico, ftalocianinas, clorinas e fenotiazinas (Carrera et al., 2016; Verger et al., 2021).

O grupo das fenotiazinas, como azul de metileno e azul de toluidina (TBO), apresenta estrutura molecular fundamental composta de anel aromático tricíclico e heteroátomos de nitrogênio e enxofre, além de carga molecular catiônica (Vara et al., 2019). O azul de metileno foi inicialmente utilizado como corante histológico, posteriormente demonstrou resultados positivos na TFD em tumores e mais recentemente na fotoinativação de bactérias, leveduras e protozoários (Figueiredo-Godoi et al., 2019; Pinto et al., 2017; Tardivo et al., 2005; Varzandeh et al., 2021).

O azul de metileno pode estar presente na forma de monômero ou dímero e apresenta absorção em comprimento de onda na faixa de 550 a 700 nm, sendo que o monômero tem absorção máxima de 664 nm e o dímero próximo de 590 nm (Tardivo et al., 2005). O arranjo do azul de metileno influencia diretamente no mecanismo fotoquímico e seus respectivos produtos. O monômero produz oxigênio singlete pelo mecanismo do tipo II, já o dímero, resulta na reação do tipo I, gerando superóxidos (Junqueira et al., 2016). Na terapia fotodinâmica antimicrobiana, o mecanismo do tipo II apresenta maior eficácia na erradicação microbiana devido ao oxigênio singlete atuar sob estruturas como DNA, proteínas e lipídeos, gerando estresse oxidativo (Yan et al., 2023).

A concentração do azul de metileno também é um fator importante, sendo relatado que concentrações elevadas podem prejudicar a ação fotodinâmica. Esse

fenômeno é conhecido como escudo óptico, pois soluções de azul de metileno muito concentradas podem impedir a passagem adequada de luz, reduzindo a eficiência da terapia (Garcez et al., 2016).

O azul de metileno é comumente utilizado na clínica odontológica como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica para tratamentos em endodontia, periodontia e estomatologia. No entanto, sua formulação aquosa reduz a retenção e imobilização do fotossensibilizador no local de aplicação, como por exemplo no palato, podendo resultar em redução da eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (Junqueira et al., 2016).

Atualmente, os fotossensibilizadores em desenvolvimento têm como objetivo melhorar a seletividade e entrega do composto até o sítio alvo por meio da conjugação com moléculas e estruturas carreadoras, como peptídeos, lipoproteínas, polímeros e nanopartículas (Mokwena et al., 2018), formando diferentes sistemas de entrega de fotossensibilizadores.

2.2 Sistemas de entrega de fotossensibilizadores

Sistemas de entrega de fotossensibilizadores (*Drug delivery systems*) são desenvolvidos com a finalidade de potencializar a ação fotodinâmica ou como estratégia terapêutica quanto à forma de administração do fotossensibilizador (Zhou et al., 2021). Os sistemas de entrega variam conforme a composição, estrutura dimensional e características físico-químicas, podendo ser de origem orgânica ou inorgânica (Silvestre et al., 2021).

Os hidrogéis são polímeros considerados materiais promissores para sistemas de entrega devido a sua capacidade de carreamento, encapsulamento e proteção de substâncias, além de características como biocompatibilidade, biodegradação, ausência de toxicidade e baixo custo (de Camargo Ribeiro et al., 2020; Silvestre et al., 2021; Yoneda et al., 2021). Hidrogéis são malhas tridimensionais compostas, aproximadamente, de 99% de água e 0,1 a 2% de cadeias poliméricas reticuladas de origem natural ou sintética (Silvestre et al., 2021). Assim, a porção polimérica pode ser de origem vegetal no caso da goma acácia, animal como a quitosana, microbiana no caso da goma xantana e gelana, e de algas marinhas como

o alginato (Das, Giri, 2020).

Entre os hidrogéis, a goma gelana (do inglês *gellan gum*) é um exopolissacarídeo de elevado peso molecular produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea* e suas propriedades de gelificação dependem da adição de cátions monovalente ou divalentes, como magnésio ou cálcio. O *gellan gum* tem aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia como aditivo alimentar e em pesquisas de formulações farmacêuticas para o encapsulamento de drogas, células e microrganismos (de Camargo Ribeiro et al., 2020; Das, Giri, 2020; Osmalek et al., 2014). Devido à reticulação das cadeias poliméricas dos hidrogéis, estes sistemas têm como característica a absorção de grandes quantidades de água na composição, característica a qual favorece a liberação rápida de compostos encapsulados (Frade et al., 2018; Lin, Metters, 2006). Além da estabilidade em ampla faixa de pH entre 3 e 13, o *gellan gum* mantém seu estado de gelificação em temperaturas elevadas (Das, Giri, 2020; Villarreal-Otalvaro, Coburn, 2021).

Como citado anteriormente, a goma gelana é um exopolissacarídeo aniônico produzido via fermentação aeróbia pela bactéria *S. elodea*, cuja composição do polímero consiste em configuração linear com repetições do tetrassacarídeo composto por α -L-ramnose, β -D-glucose e β -D-ácido glucurônico, na proporção 1:2:1. Sua estrutura pode ser de baixo teor acila (*low acyl*) ou alto teor acila (*high acyl*), atributo o qual varia conforme composição de subunidade na sua estrutura e que interfere diretamente nas características físico-químicas do material (Lorenzo et al., 2013; Osmalek et al., 2014).

A forma nativa do *gellan gum* contém grupos acetato e glicerato ligados ao primeiro monossacarídeo β -D-glucose da cadeia, conformando o polímero acetilado, ou de elevado teor acila. Estes grupos conferem ao *gellan gum* de alto acila elasticidade. O *gellan gum* de baixo acila é produzido a partir do acetilado em condições alcalinas e em elevada temperatura, promovendo a desacetilação do polissacarídeo e resultando em polímero rígido e com maior termoestabilidade, características que tornam a forma desacetilada mais utilizada e atrativa para pesquisas (Muthukumar et al., 2019; Villarreal-Otalvaro, Coburn, 2021).

A gelificação do *gellan gum* decorre da conformação das cadeias poliméricas na forma de dupla hélice em sentido anti-horário que por meio da adição de cátions,

reduz a repulsão entre as cadeias e promove zonas de junção. Os cátions atuam como *cross-linker* no processo de reticulação do hidrogel, podendo ser monovalentes, como K^+ , Li^+ e Na^+ , divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} ou trivalentes como Al^{3+} (Oliveira Cardoso et al., 2017; Villarreal-Otalvaro, Coburn, 2021).

2.3 *Candida albicans* e candidose bucal

A Organização Mundial da Saúde listou patógenos conforme a urgência de desenvolvimento de novos antimicrobianos tendo em vista o aumento de notificações de cepas multirresistentes. Dentre os microrganismos de prioridade crítica, pode-se citar a bactéria Gram-negativa *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenems e na categoria de elevada prioridade está a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina ou de intermediária susceptibilidade à vancomicina (Escolà-Vergé et al., 2020). Além das bactérias, fungos também têm apresentado caráter de resistência aos principais antifúngicos. Vale destacar a espécie *C. albicans* como importante patógeno de infecções em unidades de tratamento intensivo e *Candida auris*, como uma espécie emergente, sendo ambas de caráter oportunista (Costa-de-Oliveira, Rodrigues, 2020; Keighley et al., 2021). Diante desta urgência, busca-se métodos alternativos e complementares aos fármacos convencionais, sendo uma delas a terapia fotodinâmica antimicrobiana.

Bactérias Gram-positivas apresentam maior susceptibilidade à inativação fotodinâmica devido à composição simples da parede celular de peptideoglicano permitir maior porosidade aos fotossensibilizadores e espécies reativas de oxigênio quando comparado com bactérias Gram-negativas, que apresentam lipopolissacarídeos que conferem carga negativa no entorno da bactéria e reduzem a permeabilidade de compostos (Carrera et al., 2016; Hou et al., 2022). Além da composição celular, algumas espécies de microrganismos, como *C. albicans*, são capazes de se organizarem sob a forma de biofilme, aumentando a resistência aos fármacos quando comparadas a forma planctônica (Cieplik et al., 2014).

Os biofilmes são definidos como agregados de microrganismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, capazes de desenvolver um microambiente

propício para proliferação da comunidade. O estabelecimento de um biofilme tem início com a adesão reversível de células planctônicas à uma superfície. Posteriormente, mediado por estruturas adesivas, a adesão na superfície se torna irreversível e é dado início ao processo de divisão celular e produção de matriz extracelular, que consequentemente facilita a adesão e crescimento tridimensional desta população até que ocorra a dispersão das células (Dufour et al., 2010; Sauer et al., 2022)

Os biofilmes podem ser monoespécies ou polimicrobianos, sendo este último mais comum na natureza. A heterogeneidade dos microrganismos é tolerada por meio de relações sinérgicas entre os componentes do biofilme, que favorecem a proliferação de ambas as espécies e aumenta a resistência ao sistema imunológico (Dufour et al., 2010). Além disso, o desenvolvimento do biofilme pode ser coordenado por meio de moléculas sinalizadoras secretadas pelos microrganismos, que são capazes de aumentar ou reduzir a expressão de genes alvo, mecanismo denominado *quorum sensing* (Alkatheri et al., 2022).

C. albicans é um fungo de grande interesse na odontologia devido à sua capacidade de organização em biofilmes monoespécie ou polimicrobianos, que podem potencializar os fatores de virulência do fungo na cavidade bucal (Satala et al., 2022). É um fungo comensal, isto é, capaz de colonizar mucosas de indivíduos saudáveis, sendo seu crescimento controlado pelo sistema imunológico. No entanto, diante de condições favoráveis, torna-se oportunista e pode resultar em infecção, desenvolvendo a candidose bucal (Patel, 2022). A transição da forma comensal para a patogênica é multifatorial e envolve as características do sistema imunológico do hospedeiro, tipos de dieta e fatores de virulência do fungo. Alterações do ambiente oral são facilmente detectadas pelo fungo, promovendo alterações morfológicas na célula, que passam de blastoconídios para as formas de hifa ou pseudohifa (Lu, 2021).

A patogenicidade da *C. albicans* tem início com a fixação do fungo nas células epiteliais do hospedeiro por meio das adesinas ALS2 e ALS3 da família das adesinas *Agglutinin-Like Sequence* (Rodríguez-Cerdeira et al., 2020). A proteína Hwp1 (*Hyphal wall protein 1*) presente na parede celular das hifas também é considerada um fator de virulência que favorece a adesão do fungo no epitélio do hospedeiro, sendo sua expressão aumentada durante o processo de infecção oral (Patel, 2022). A penetração do fungo através da camada epitelial é viável devido à ação de enzimas

hidrolíticas como a família das lipases (LIP 1-10), fosfolipase B1 (Plb1) e protease aspártica (*Secretory Aspartic Proteinases* - Sap) (Sap 1-10), além da toxina citolítica candidalisina (Gao et al., 2021; Patel, 2022; Rodríguez-Cerdeira et al., 2020). As Saps são consideradas fatores de virulência determinantes na patogenicidade de *C. albicans*, visto que atuam diretamente no processo de adesão e invasão tecidual, além de promover a evasão do sistema imunológico por meio da degradação de anticorpos, citocinas e componentes do complemento, além de estruturas teciduais como queratina e colágeno (Monika et al., 2017; Rodríguez-Cerdeira et al., 2020).

O diagnóstico da candidose oral é feito através da avaliação das lesões presentes no dorso da língua, palato, faringe e mucosa bucal. A candidose oral se apresenta clinicamente sob a forma primária, quando as lesões se encontram localizadas, ou secundária quando estão generalizadas (Talapko et al., 2021). A candidose pseudomembranosa é, em sua maioria, assintomática e se apresenta por placas esbranquiçadas de fácil remoção nos palatos duro e mole, língua, mucosa e orofaringe (Lewis, Williams, 2017; Millsop, Fazel, 2016; Talapko et al., 2021). Sua condição clínica está associada ao uso de antibióticos e medicamentos imunossupressores e é um achado clínico comum em neonatos e imunodeficientes, como pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Lewis, Williams, 2017).

Outra forma comum de candidose é a eritematosa, caracterizada por lesões avermelhadas, podendo ser aguda ou crônica. A forma aguda está associada ao uso de antibióticos que promovem desequilíbrio na comunidade microbiana da boca e facilitam a proliferação da *Candida*. Já a forma eritematosa crônica é comum em pacientes que fazem uso de próteses, podendo se apresentar por lesões avermelhadas, edemaciadas e restritas à área do dispositivo oral (Millsop, Fazel, 2016).

O tratamento da candidose oral se baseia na administração de antifúngicos tópicos ou sistêmicos, sendo este último utilizado em casos com potencial de disseminação. Há três classes terapêuticas indicadas e disponíveis no mercado para o tratamento da candidose, sendo elas os polienos, azóis e equinocandinas (Anuța et al., 2022). A classe dos polienos, que inclui a anfotericina B e nistatina, tem como alvo o ergosterol, resultando na formação de poros e alteração da permeabilidade celular (Millsop, Fazel, 2016). A nistatina é utilizada em candidose de paciente com lesões

localizadas de forma tópica devido à baixa absorção gastrointestinal do fármaco (Lu, 2021). A anfotericina B também é uma opção da classe dos polienos, podendo ser utilizada de forma tópica ou sistêmica via intravenosa, no entanto, devido aos efeitos nefrotóxicos e baixa biodisponibilidade, não é mais considerada a escolha terapêutica primária para os casos de risco sistêmico (Logan et al., 2022; Millsop, Fazel, 2016).

Exemplificando a classe dos azóis têm-se o miconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição da síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase alterando a morfologia da célula e inibindo o crescimento fúngico (Anuța et al., 2022). Devido à ação fungistática, os azóis foram utilizados como profiláticos, contribuindo com o desenvolvimento de resistência a esta classe. Dentre os mecanismos de resistência, pode-se citar a ativação de bombas de efluxo via expressão dos genes MDR e CDR capazes de reduzir a concentração do fármaco no meio intracelular, e o aumento na expressão dos genes ERG3 e ERG11, que atuam na síntese do ergosterol (Tortorano et al., 2021a; Zhou et al., 2018)

A classe das equinocandinas, representada pela caspofungina, anidulafungina e micafungina, atua via inibição da enzima (1,3)- β -D-glucano sintase, responsável pelo componente β (1,3)-glucano, essencial para integridade da parede celular. A enzima é codificada pelos genes FKS1 e FKS2, que são alvo dos fármacos, dessa forma, como mecanismo de resistência, determinadas cepas são capazes de mutação nos genes FKS e passíveis de produção de componentes celulares que não a glucana, como por exemplo a quitina (Anuța et al., 2022; Tortorano et al., 2021b).

Diante dos mecanismos de resistência apresentados e a notificação crescente de cepas resistentes aos tratamentos convencionais disponíveis, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas e/ou complementares que visem a redução da carga fúngica em casos de candidose oral. Dessa forma, nesse trabalho foi proposto investigar a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana, utilizando-se um sistema carreador de azul de metileno de goma gelana, sobre *C. albicans* em crescimento planctônico e biofilme, a fim de beneficiar a aplicação clínica da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um sistema carreador de azul de metileno em *gellan gum* e avaliar os efeitos na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *Candida albicans*.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Incorporar o azul de metileno em diferentes concentrações de *gellan gum* e estágios de gelificação e avaliar a capacidade de liberação desse fotossensibilizador em função do tempo;
- Caracterizar o sistema carreador em *gellan gum* em relação as propriedades fotodinâmicas por meio da avaliação da formação de escudo óptico e espectroscopia de absorção no UV-visível;
- Avaliar os efeitos do sistema carreador do azul de metileno em *gellan gum* na terapia fotodinâmica contra *C. albicans* em culturas planctônica e biofilme.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo da solução de azul de metileno (AM)

O azul de metileno em pó (M9140, Sigma Aldrich) foi preparado em água destilada na concentração de 1250 μM . Posteriormente, a solução foi filtrada em membrana filtrante estéril com poros de tamanho 0,22 μm e armazenada em local escuro até o momento do uso.

4.2 Incorporação do azul de metileno no hidrogel de *gellan gum*

O pó de *gellan gum* (Gelzan™CM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) foi pesado em balança de precisão na concentração desejada, conforme descrito no Quadro 1. Posteriormente, foi acrescido o valor fixo de 45 mL de água destilada, seguido de agitação e breve aquecimento em micro-ondas sem deixar a mistura ferver. Com a solução em aspecto homogêneo, o material foi autoclavado em temperatura de 120°C por 15 minutos.

Para a incorporação do fotossensibilizador no *gellan gum* foi utilizado o volume fixo de 2 mL para cada concentração de azul de metileno a ser testada no estudo. Na ausência de luz, esse volume da solução de azul de metileno foi transferido para tubo tipo cônico contendo o hidrogel autoclavado e vortexado pelo tempo de 1 min.

Após a incorporação do azul de metileno, foi realizada a adição do cloreto de cálcio (CaCl_2) em concentração padronizada de 1 mM e volume fixo de 3 mL com a finalidade de gelificar a solução. Por fim, o material preparado foi armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Quadro 1 - Preparo do sistema carreador de azul de metileno utilizando-se *gellan gum* em diferentes concentrações de gelificação

Componentes	Concentração do <i>gellan gum</i>	
	1,0%	0,6%
Água destilada (mL)	45	45
Pó de <i>gellan gum</i> (mg)	500	300
Cloreto de cálcio (1µM) (mL)	3	3
Azul de metileno em diferentes concentrações (mL)	2	2

Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2020)

4.3 Teste de liberação do azul de metileno

Inicialmente, foi determinada a curva padrão espectrofotométrica do azul de metileno. Para isso, foram preparadas soluções desse fotossensibilizador em concentrações entre 0,7 µM e 50 µM, cujos valores de absorbância foram determinados em comprimento de onda de 660 nm no leitor de microplaca equipamento Epoch (BioTek - Agilent, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos). A equação da reta foi gerada pelo programa Microsoft Excel e o gráfico plotado no software GraphPad Prism 5.0.

Para o teste de liberação do azul de metileno do hidrogel de *gellan gum*, o método de imersão total foi adotado com modificações do trabalho de Suhail et al. (2022). Amostras de 1 mL dos hidrogéis foram transferidas para béqueres contendo 10 mL de água destilada, seguido de incubação em temperatura de 37°C sob agitação de 100 rpm no escuro. Em tempos pré-definidos, foram coletadas alíquotas de 2 mL para leitura em espectrofotômetro Epoch (BioTek - Agilent, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) em comprimento de onda de 664 nm. O volume retirado do sistema foi substituído com água destilada após cada leitura e as concentrações foram determinadas conforme a equação da reta do fotossensibilizador. A leitura de liberação foi de 25 minutos com intervalos de 1 minuto para construção gráfica. O experimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada hidrogel teste e o resultado foi

dado por média aritmética.

4.4 Caracterização do sistema carreador de azul de metileno em *gellan gum* de acordo com as propriedades fotodinâmicas

4.4.1 Espectroscopia de absorção na região UV-Visível

A fim de caracterizar cada hidrogel quanto ao espectro de absorção e determinar o comprimento de onda em que a absorção é máxima, foi utilizada a espectroscopia que abrange da região ultravioleta ao visível. Foram analisadas amostras de água destilada, azul de metileno aquoso (50 μM), hidrogel de 0,6% e 1,0% (m/v) contendo água destilada e hidrogel de 0,6% e 1,0% (m/v) contendo azul de metileno (50 μM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Epoch (BioTek - Agilent, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) em placa de 96 poços de fundo plano para análise na região do UV-visível, com início no comprimento de 200 nm até 900 nm, com intervalo de leitura de 1 nm. Os resultados foram gerados por meio do software Gen5 (BioTek - Agilent, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos).

4.4.2 Teste do escudo óptico

O teste do escudo óptico consistiu na avaliação da passagem de luz nos hidrogéis de *gellan gum* nas concentrações 0,6% (m/v) e 1,0% (m/v) contendo o azul de metileno.

Os hidrogéis de *gellan gum* contendo azul de metileno foram transferidos para cubeta de quartzo com quatro faces polidas e largura interna de 10 mm (Kasvi, São Paulo, Brasil) focalizadas diante de uma câmera digital (EOS Rebel T6, Canon). Posteriormente, uma ponteira laser (KP-8008, Knup, Bom Retiro, São Paulo, Brasil) foi colocada frente a cubeta e as imagens, captadas perpendicularmente, avaliadas

no software ImageJ (National Institute of Health, EUA) em escala de cinza, sendo os valores obtidos por pixel plotados em gráfico de escala de cinza por distância (cm).

4.5 Efeitos do sistema carreador de azul de metileno em *gellan gum* na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *C. albicans*

4.5.1 Ativação dos microrganismos

No presente estudo, foi utilizada cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804) mantida em estoques congelados em caldo BHI com 20% de glicerol em freezer a -80°C, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos / UNESP. Para ativação da cepa, após descongelamento, uma alçada foi plaqueada em ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), seguido de incubação a 37°C por 48 horas em estufa.

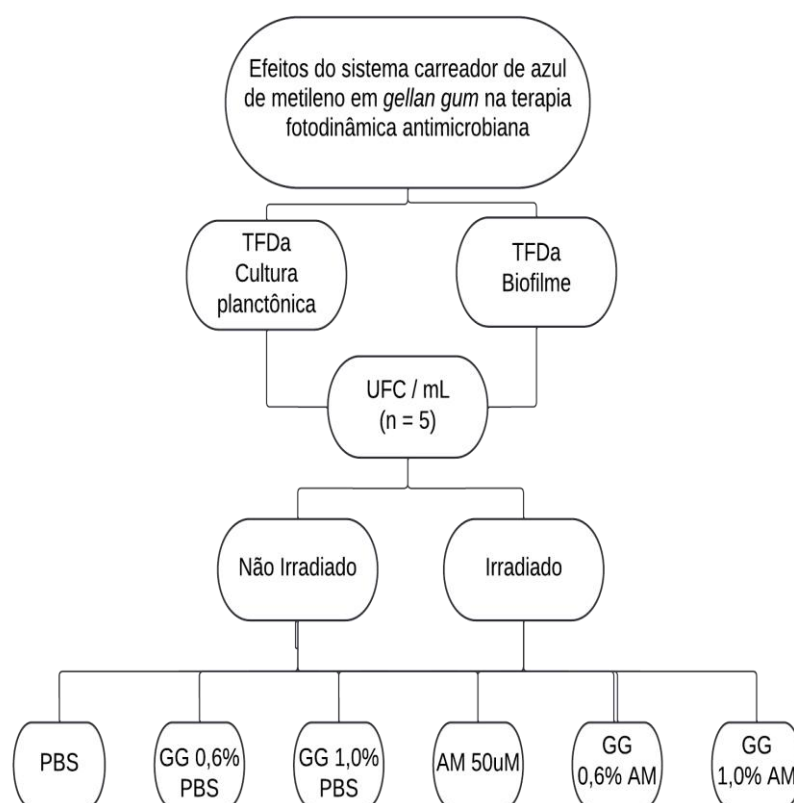
4.5.2 Fonte de luz

A fonte de luz utilizada foi o equipamento Irrad-Led (Biopdi, São Carlos, SP, Brasil) composto por 48 LEDs emissores de comprimento de onda em 660 nm (vermelho visível), com potência individual de 3 W por LED. A área interna de irradiação apresenta 16 cm de largura e 11 cm de profundidade. Os parâmetros de irradiação foram ajustados conforme o trabalho de Lapena et al. (2022). As configurações de irradiação foram ajustadas para densidade de energia de 30,56 J/cm², densidade de potência de 42,8 mW/cm² e tempo de 714 segundos.

4.5.3 Grupos experimentais

Os grupos experimentais para o estudo da terapia fotodinâmica antimicrobiana em cultura planctônica e biofilme estão descritos na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma e distribuição dos grupos experimentais para os testes *in vitro* de *C. albicans* em culturas planctônicas e biofilmes



Legenda: PBS (grupo controle); GG 0,6% PBS (*gellan gum* 0,6% contendo PBS); GG 1,0% PBS (*gellan gum* 1,0% contendo PBS); AM (azul de metileno aquoso em concentração 50 μ M); GG 0,6% AM (*gellan gum* 0,6% contendo azul de metileno); GG 1,0% AM (*gellan gum* 1,0% contendo azul de metileno).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.4 Terapia fotodinâmica em células planctônicas de *C. albicans*

Após ativação do microrganismo em ágar Sabouraud, colônias de *C. albicans*

foram coletadas e suspensas em solução PBS. A seguir, foi realizada a contagem e padronização do número de células na suspensão, utilizando-se Câmara de Neubauer espelhada (Laboroptik GmbH, Alemanha). A concentração final da suspensão de *C. albicans* estabelecida foi 10^3 células/mL.

A fotossensibilização da cultura planctônica de cada suspensão foi realizada em placa de 96 poços e os ensaios divididos conforme grupos experimentais apresentados na Figura 1, sendo que em cada poço foi adicionado 100 µL da suspensão padronizada e 100 µL da solução respectiva ao grupo experimental. Após preparo da placa, estas foram envoltas em papel alumínio para evitar exposição à luz.

As placas permaneceram no escuro sob agitação por 15 minutos (pré-irradiação) e em seguida foram irradiadas conforme descrito anteriormente.

Após irradiação, o conteúdo dos poços foi diluído na proporção de 1:10 em microplacas de diluição (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS). Cada diluição foi plaqueada pela técnica da gota em quadruplicada em ágar Sabouraud Dextrose e incubada por 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, realizou-se a contagem e o número de unidades formadoras de colônia foi determinado em UFC/mL.

4.5.5 Terapia fotodinâmica em biofilme

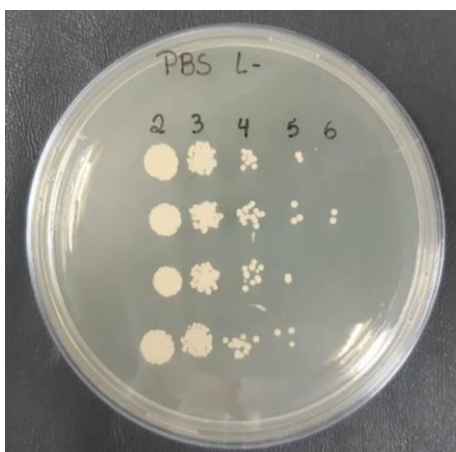
Após ativação do microrganismo, colônias foram coletadas do ágar Sabouraud Dextrose e transferidas para tubo tipo cônico contendo caldo Yeast Nitrogen Base (YNB - BD Difco, São Paulo, Brasil) acrescido de 5% de sacarose, seguido de incubação por 24 horas à 37°C em rotação de 75 rpm. Passado o período de incubação, a suspensão foi centrifugada à 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de PBS esterilizado. Este procedimento foi realizado duas vezes. Ao desprezar o conteúdo da última centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em caldo YNB acrescido de sacarose a 5%. Conforme o trabalho de dos Santos et al. (2020), a suspensão foi padronizada em 10^7 células/mL com auxílio da Câmara de Neubauer e distribuída em placa de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C sob agitação

de 75 rpm. Após período de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e os poços lavados duas vezes com PBS estéril.

Foram adicionados aos poços 200 μ L de PBS, *gellan gum* 0,6% (m/v) com PBS, *gellan gum* 1,0% (m/v) com PBS, azul de metileno aquoso (50 μ M), *gellan gum* 0,6% (m/v) com azul de metileno ou *gellan gum* 1,0% (m/v) com azul de metileno, conforme o grupo experimental. As placas foram envoltas em papel alumínio e colocadas em agitador orbital por 15 minutos (pré-irradiação), seguido de irradiação conforme parâmetros descritos anteriormente.

Ao final do tratamento, os biofilmes foram desprendidos da placa com auxílio de homogeneizador ultrassônico com potência de 7 W por 30 segundos. O conteúdo dos poços foi diluído na proporção de 1:10 em microplacas de diluição contendo solução PBS. Cada diluição foi plaqueada pela técnica da gota (Figura 2) em quadruplicada em ágar Sabouraud Dextrose e incubada por 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, realizou-se a contagem e o número de unidades formadoras de colônia foi determinado em UFC/mL.

Figura 2 - Imagem ilustrativa do plaqueamento pela técnica da gota para contagem de UFC/mL de *C. albicans*



Legenda: Placa de Petri com ágar Sabouraud Dextrose, contendo gotas com as diluições do biofilme para contagem de UFC/mL. Primeira coluna é a diluição -2, segunda é a diluição -3, terceira é a diluição -4, quarta é a diluição -5 e a última é a diluição -6.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Análise estatística

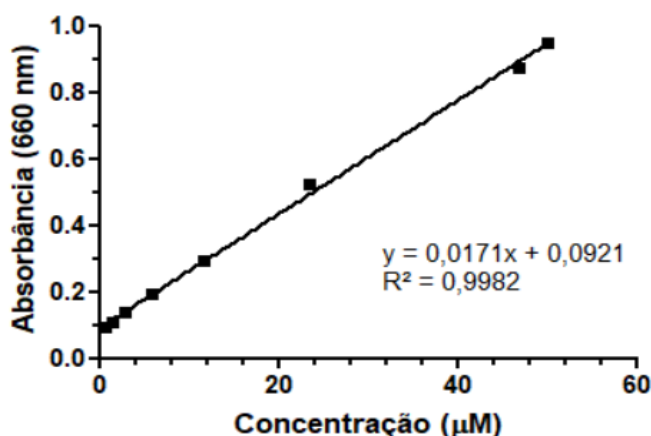
Os resultados obtidos da contagem de UFC/mL em culturas planctônicas e biofilmes foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e pós teste de Tukey com nível de significância de 5%. O programa GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para elaboração dos gráficos e realização das comparações estatísticas, considerando-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de liberação do azul de metileno

Para realização do teste de liberação do azul de metileno do *gellan gum*, inicialmente foi necessário determinar a curva padrão espectrofotométrica do azul de metileno em solução aquosa. O resultado da curva padrão espectrofotométrica do azul de metileno aquoso obtida está representada na Figura 3.

Figura 3 - Gráfico da curva padrão espectrofotométrica do azul de metileno em solução aquosa



Legenda: Gráfico da curva padrão do azul de metileno, sendo a concentração do azul de metileno em micromolar (µM) no eixo X e a respectiva absorbância em 660 nm no eixo Y.

Fonte: Elaborado pela autora.

A curva padrão do azul de metileno teve como equação da reta a seguinte fórmula:

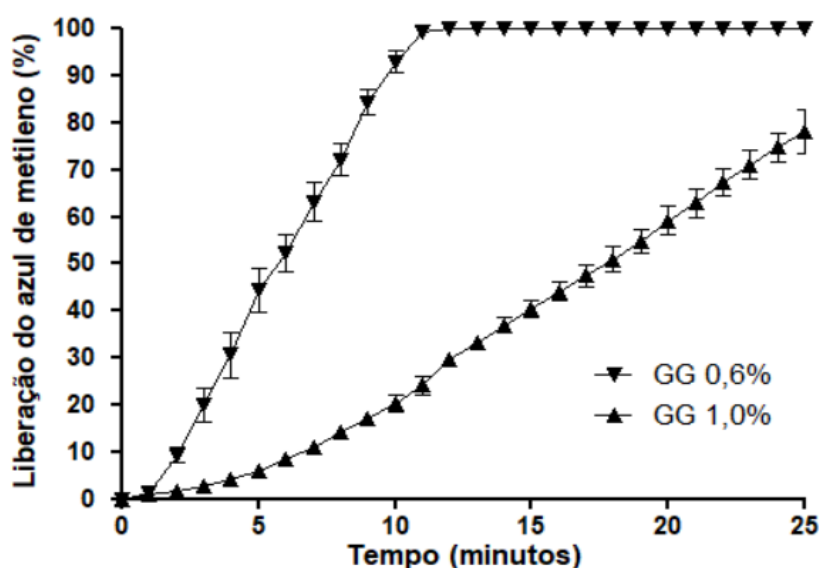
$$y = 0,0171x + 0,0921$$

Onde “y” corresponde à absorbância e “x” se refere à concentração do azul

de metileno em “ μM ”. O valor do coeficiente de determinação da regressão (R^2) foi de 0,9982.

A seguir, foi determinada a taxa de liberação do azul de metileno incorporado ao *gellan gum*. O gráfico de liberação do AM do *gellan* em função do tempo (Figura 4) foi determinado com base na curva padrão do fotossensibilizador que permitiu calcular as concentrações liberadas do azul de metileno pelos hidrogéis de 0,6% e 1,0% (m/v) de *gellan gum* no meio reacional durante o intervalo de 0 a 25 minutos.

Figura 4 – Gráfico da porcentagem de liberação do azul de metileno dos hidrogéis de 0,6% e 1,0% (m/v) em função do tempo em minutos



Legenda: *Gellan gum* 0,6% (m/v) contendo azul de metileno (GG 1,0%); *Gellan gum* 1,0% (m/v) contendo azul de metileno (GG 1,0%).

Fonte: Elaborado pela autora.

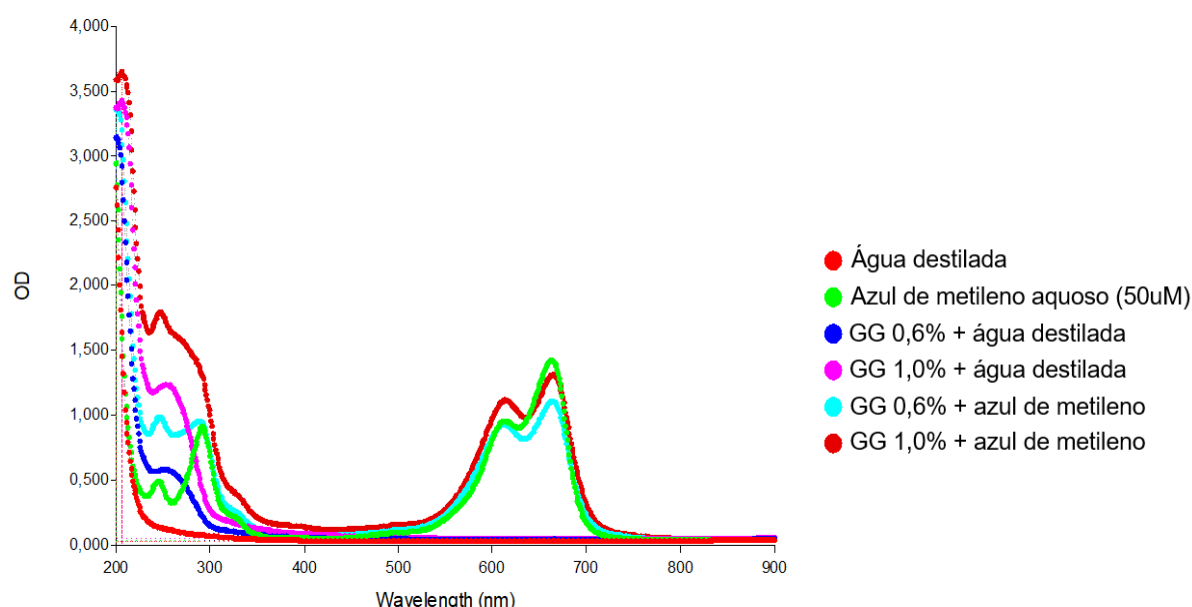
Após avaliação em triplicata, observou-se liberação mais rápida para o hidrogel de 0,6% (m/v), atingindo 100% de liberação no tempo de 10 min. Para o mesmo período experimental, o hidrogel de 1,0% (m/v) resultou em menor liberação, com cerca de 80% do total, além de demandar maior tempo de exposição ao meio reacional para obter esta liberação. Estes resultados indicaram que quanto maior a

concentração do *gellan* na relação massa/volume (m/v), maior foi a retenção do fotossensibilizador e, conseqüentemente, mais prolongada foi a liberação do AM.

5.2 Espectroscopia de absorção na região UV-Visível

Para avaliar o espectro de absorção do azul de metileno quando incorporado ao *gellan gum*, foi realizada a análise de espectroscopia de absorção na região UV-Visível. A Figura 5 apresenta a leitura de absorbância na região do UV-Visível (200 a 900 nm) das amostras de água destilada, *gellan gum* (GG) nas concentrações de 0,6% e 1,0% com água destilada, *gellan gum* (GG) nas concentrações de 0,6% e 1,0% e acrescidos de azul de metileno com concentração final de 50 μ M, e azul de metileno em solução aquosa na concentração final de 50 μ M.

Figura 5 - Gráfico da espectroscopia na região do UV-Visível (200 a 900 nm) do azul de metileno em solução aquosa e incorporado ao *gellan gum*



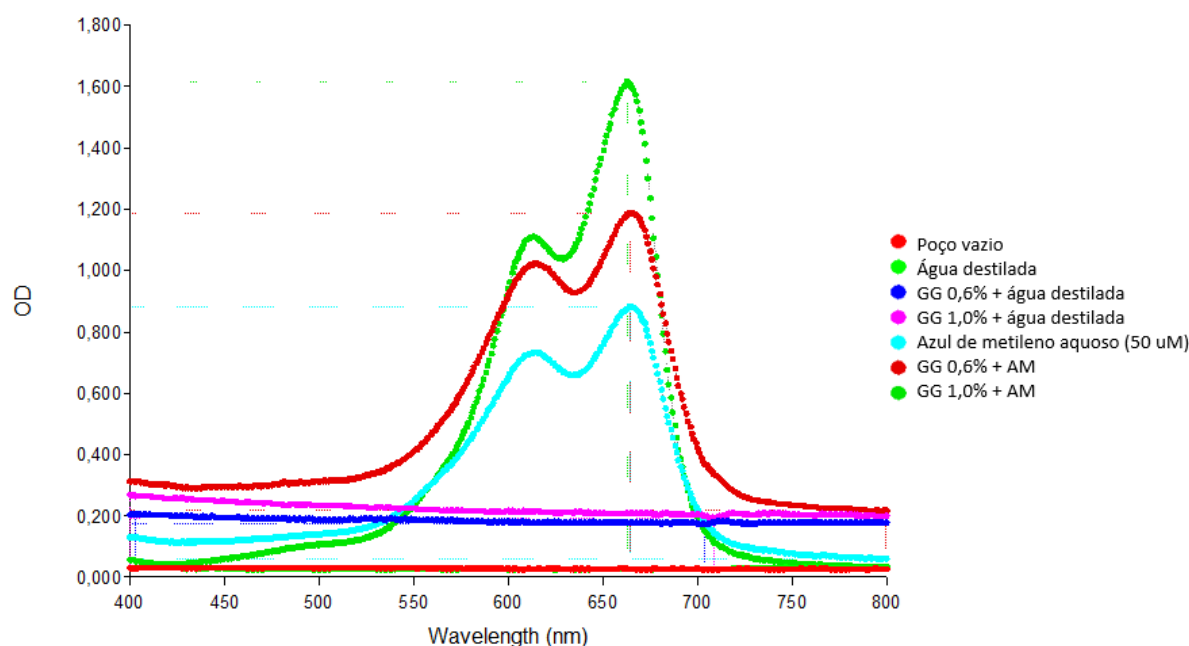
Legenda: Hidrogel de *gellan gum* em 0,6% (m/v) (GG 0,6%); Hidrogel de *gellan gum* em 1,0% (m/v) (GG 1,0%). No eixo Y consta a densidade óptica (OD – *Optical density*) referente à absorção da luz pelas substâncias testadas. No eixo X consta o comprimento de onda em nanômetros da luz emitida pelo equipamento no processo de varredura.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 5, pode-se observar que o hidrogel de *gellan gum* de 0,6% e 1,0% apresentaram pico de absorção em comprimento de onda próximo de 250 nm. Já os grupos com azul de metileno aquoso ou incorporado ao *gellan gum* tiveram picos de absorção próximos de 300 nm e picos mais fortes de absorção entre 600 e 700 nm.

Para facilitar a visualização dos picos de absorção dos grupos com azul de metileno, foi elaborado um gráfico com região de leitura entre 400 e 800 nm (Figura 6). Nessa figura 6, foi possível verificar que o azul de metileno aquoso apresentou duas bandas fortes de absorção em 600 e 660 nm, sendo este o pico de absorção do AM já conhecido. A adição do azul de metileno nos hidrogéis de *gellan gum* de 0,6% e 1,0% não interferiu no pico de absorção do fotossensibilizador, que se manteve em 660 nm.

Figura 6 - Gráfico da espectroscopia na região do UV-Visível



Legenda: Hidrogel de *gellan gum* em 0,6% (m/v) (GG 0,6%); Hidrogel de *gellan gum* em 1,0% (m/v) (GG 1,0%). No eixo Y consta a densidade óptica (OD – *Optical density*) referente à absorção da luz pelas substâncias testadas. No eixo X consta o comprimento de onda em nanômetros da luz emitida pelo equipamento no processo de varredura.

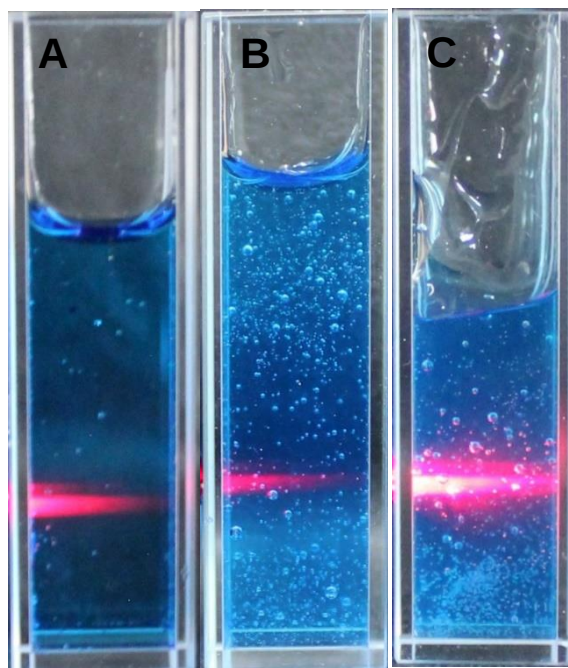
Fonte: Elaborado pela autora.

O gráfico de espectroscopia indica visualmente maior proporção do azul de metileno sob forma agregada de monômero ($\lambda = 660$ nm) quando comparado com o dímero ($\lambda = 610$ nm), tanto na forma aquosa do fotossensibilizador quanto nos hidrogéis de 0,6% e 1,0%.

5.3 Escudo óptico

A fim de verificar se o *gellan gum* poderia interferir na passagem da luz, foi realizado o teste de escudo óptico. Verificou-se que a passagem do feixe de laser pelo percurso óptico de 1 cm foi bem-sucedida para as formulações de azul de metileno em concentrações de 0,6 e 1% de *gellan gum*, de modo semelhante à solução aquosa de azul de metileno. Esses resultados foram obtidos por análise visual (Figura 7) e análise quantitativa por representação gráfica (Figura 8).

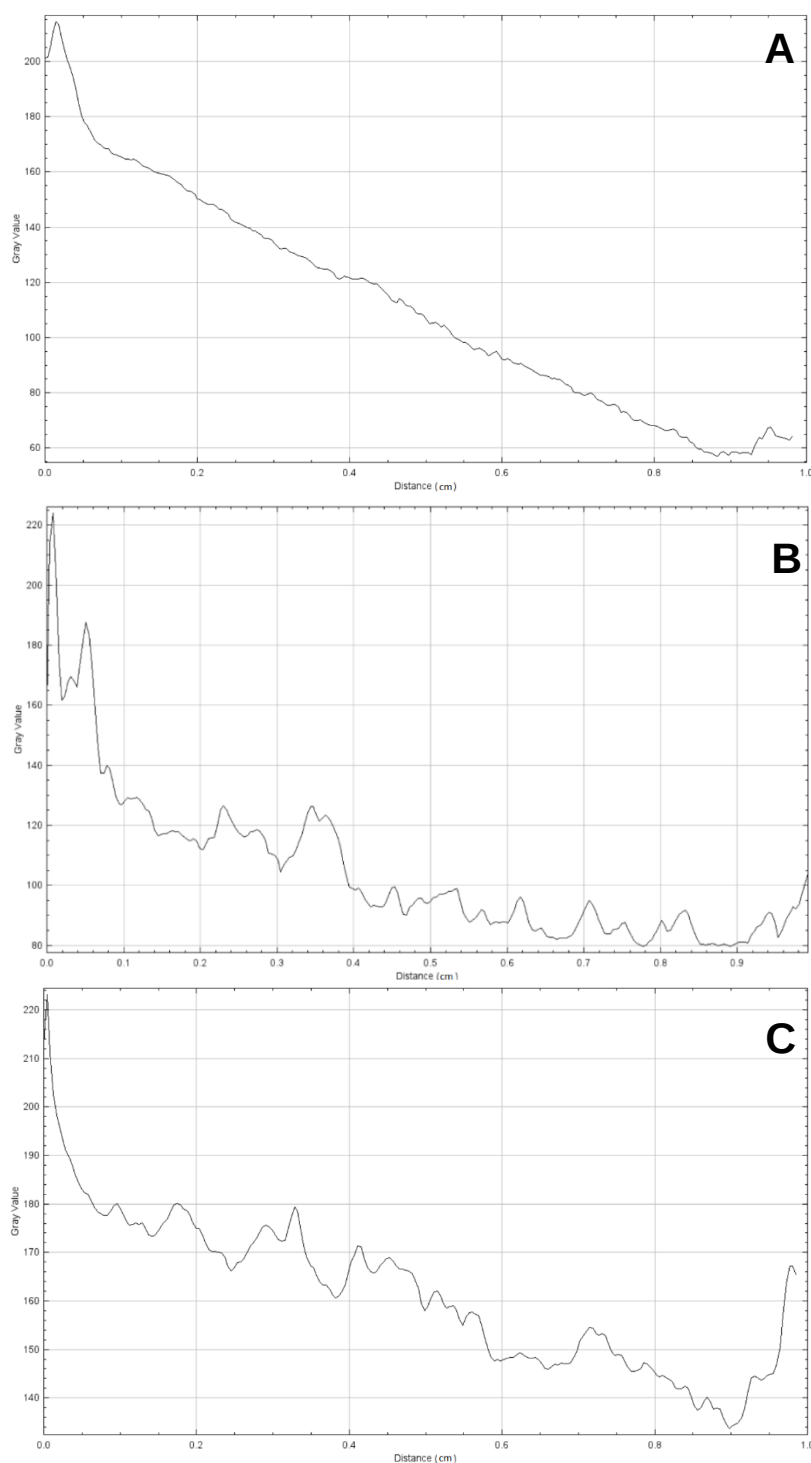
Figura 7 – Teste do escudo óptico para análise da passagem de luz nas formulações de azul de metileno em *gellan gum* e em solução aquosa



Legenda: (A) Azul de metileno aquoso (50 μ M); (B) Hidrogel de *gellan gum* em 0,6% (m/v) contendo azul de metileno; (C) Hidrogel de *gellan gum* em 1,0% (m/v).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 – Gráficos em escala de cinza (eixo Y) pela distância em cm (eixo X) do azul de metileno em solução aquosa (A) e em formulações de *gellan* a 0,6% (B) e 1% (C).



Legenda: (A) Azul de metileno aquoso (50 μM); (B) Hidrogel de *gellan gum* em 0,6% (m/v) contendo azul de metileno; (C) Hidrogel de *gellan gum* em 1,0% (m/v). Gráfico em escala de cinza com valor de cinza por pixel “Gray value” (eixo Y) e distância em “cm” (eixo X).

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 8, verifica-se que a intensidade da luz por pixel é proporcional ao valor na escala de cinza. Em ambos os meios se verificou a queda do valor de cinza conforme o percurso do feixe de luz na cubeta. O azul de metileno na forma aquosa (Figura 8A) demonstrou maior homogeneidade no percurso óptico, quando comparado aos hidrogéis de 0,6% (m/v) (Figura 8B) e 1,0% (m/v) (Figura 8C). Coincidentemente, os picos observados nos gráficos dos hidrogéis são respectivos às bolhas presentes no momento da análise, resultando em uma plotagem irregular. Ao final dos gráficos nota-se elevação do valor de cinza, sendo este ocorrido coincidente com a área do final da cubeta que refletiu a luz ao final do percurso. Apesar destas pequenas variações, os três meios permitiram a passagem do laser durante todo o percurso óptico.

5.4 Efeitos do sistema carreador de azul de metileno em *gellan gum* na terapia fotodinâmica contra *C. albicans*

5.4.1 Terapia fotodinâmica em cultura planctônica

Os resultados da TFD em culturas planctônicas estão apresentados na Figura 9, na qual é possível observar que o grupo controle na ausência de luz (F-L-) obteve número de células de *C. albicans* próximo a 3,5 log (UFC/mL), assim como os grupos controle *gellan gum* 0,6% (GG0,6+F-L-) e 1,0% (GG1,0+F-L-) na ausência da luz, demonstrando que o *gellan gum* isento de fotossensibilizador não resultou em ação antimicrobiana.

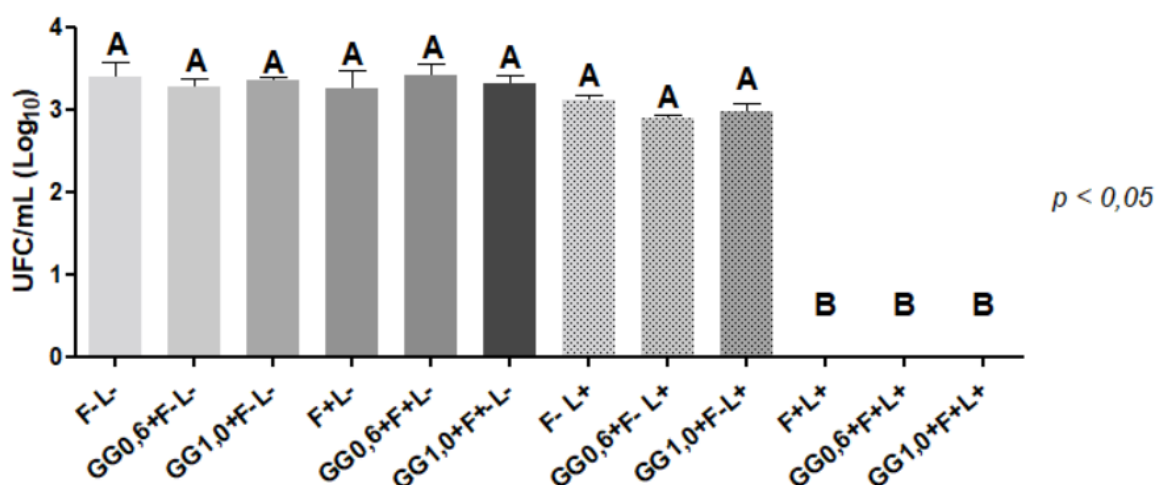
Os grupos formados por azul de metileno aquoso (F+L-), *gellan gum* 0,6% (GG0,6+F+L-) e *gellan gum* 1,0% (GG1,0+F+L-), ambos contendo o fotossensibilizador na ausência da luz, apresentaram crescimento semelhante ao do grupo controle, próximo de 3,5 log (UFC/mL), indicando que a presença do fotossensibilizador nos grupos não resultou em ação citotóxica na cultura planctônica.

Nos grupos controle da irradiação sem fotossensibilizador, observou-se concentração próxima de 3 log (UFC/mL) para os grupos controle de irradiação (F-

L+), *gellan gum* 0,6% (GG0,6+F-L+) e *gellan gum* 1,0% (GG1,0+F-L+), sugerindo que o LED na ausência do fotossensibilizador foi incapaz de atuar sobre as células leveduriformes.

Por fim, os grupos terapia fotodinâmica mediados pelo azul de metileno aquoso 50 μ M (F+L+), *gellan gum* 0,6% com azul de metileno (GG0,6+F+L+) e *gellan gum* 1,0% com azul de metileno (GG1,0+F+L+) resultaram em redução total e significativa ($p < 0,05$) da cultura planctônica. Esses dados comprovaram a ação antifúngica da terapia fotodinâmica sobre células planctônicas de *C. albicans*, além de demonstrar que os hidrogeis de *gellan gum* 0,6% (m/v) e 1,0% (m/v) foram capazes de manter as propriedades fotodinâmicas semelhantes ao do fotossensibilizador azul de metileno aquoso.

Figura 9 - Médias e desvio-padrão dos dados em UFC/mL obtidos no teste de terapia fotodinâmica em culturas planctônicas de *C. albicans*



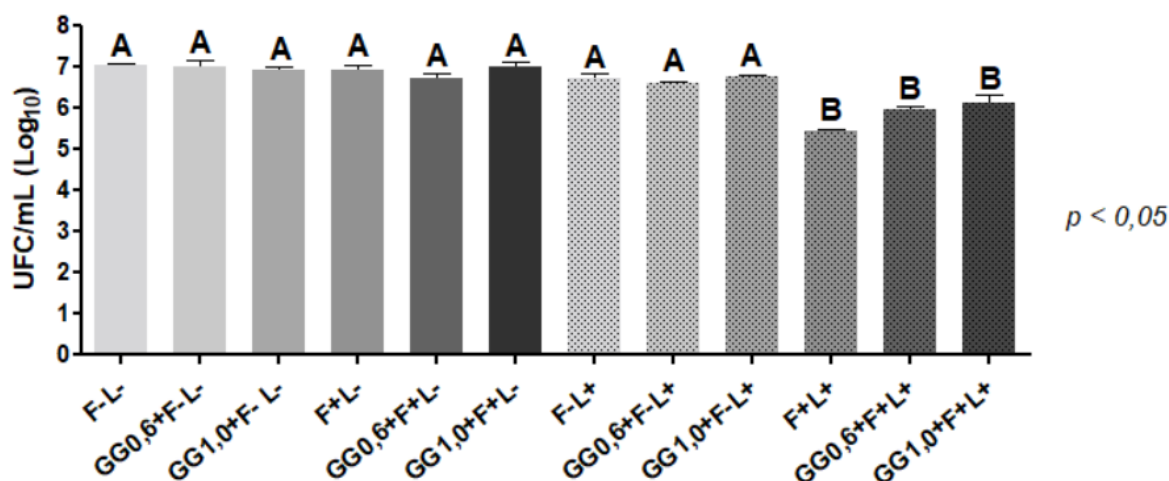
Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle *gellan gum* 0,6% na ausência de luz (GG0,6+F-L-); Grupo controle *gellan gum* 1,0% na ausência de luz (GG1,0+F-L-); Grupo azul de metileno 50 μ M na ausência de luz (F+L-); Grupo *gellan gum* 0,6% com azul de metileno na ausência da luz (GG0,6+F+L-); Grupo *gellan gum* 1,0% com azul de metileno na ausência da luz (GG1,0+F+L-); Grupo controle na presença da luz (F-L+); Grupo controle *gellan gum* 0,6% na presença de luz (GG0,6+F-L+); Grupo controle *gellan gum* 1,0% na presença de luz (GG1,0+F-L+); Grupo TFD azul de metileno (F+L+); Grupo TFD com *gellan gum* 0,6% e azul de metileno (GG0,6+F+L+); Grupo TFD com *gellan gum* 1,0% e azul de metileno (GG1,0+F+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.2 Terapia fotodinâmica em biofilme

Os resultados da terapia fotodinâmica antimicrobiana em biofilmes estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Médias e desvio-padrão dos dados em UFC/mL obtidos no teste de terapia fotodinâmica em biofilmes de *C. albicans*



Legenda: Grupo controle na ausência de luz (F-L-); Grupo controle *gellan gum* 0,6% na ausência de luz (GG0,6+F-L-); Grupo controle *gellan gum* 1,0% na ausência de luz (GG1,0+F-L-); Grupo azul de metileno 50 μ M na ausência de luz (F+L-); Grupo *gellan gum* 0,6% com azul de metileno na ausência da luz (GG0,6+F+L-); Grupo *gellan gum* 1,0% com azul de metileno na ausência da luz (GG0,6+F+L-); Grupo controle na presença da luz (F-L+); Grupo controle *gellan gum* 0,6% na presença de luz (GG0,6+F-L+); Grupo controle *gellan gum* 1,0% na presença de luz (GG1,0+F-L+); Grupo TFD azul de metileno (F+L+); Grupo TFD com *gellan gum* 0,6% e azul de metileno (GG0,6+F+L+); Grupo TFD com *gellan gum* 1,0% e azul de metileno (GG1,0+F+L+). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Os biofilmes de *C. albicans* apresentaram crescimento médio de 7 log (UFC/mL) no grupo controle (F-L-), bem como no grupo controle do *gellan gum* de 0,6% (m/v) (GG0,6+F-L-) e 1,0% (m/v) (GG1,0+F-L-). Desse modo, o *gellan gum* de ambas as formulações não foi capaz de atuar sobre o biofilme formado.

Os grupos que continham azul de metileno na ausência da luz, como o azul de metileno aquoso (F+L-), *gellan gum* 0,6% (m/v) com azul de metileno (GG0,6+F+L) e *gellan gum* 1,0% (m/v) com azul de metileno (GG1,0+F+L-) também resultaram em contagem de 7 log (UFC/mL). Esse resultado demonstrou que a presença do azul de metileno no escuro não foi capaz de reduzir a carga microbiana do biofilme e a incorporação do fotossensibilizador com o sistema carreador de *gellan gum* não teve ação citotóxica no escuro.

Quanto aos grupos irradiados na ausência do fotossensibilizador azul de metileno, o grupo controle da luz (F-L+) e o *gellan gum* 1,0% (m/v) (GG1,0+F-L+) mantiveram a contagem de 7 log (UFC/mL) semelhante ao controle F-L-.

Os grupos terapia fotodinâmica mediados por azul de metileno aquoso (F+L+), *gellan gum* 0,6% (m/v) (GG0,6+F+L+) e *gellan gum* 1,0% (m/v) (GG1,0+F+L+) apresentaram reduções significativas de, respectivamente, 1,5 log (UFC/mL), 1,0 log (UFC/mL) e 1,0 log (UFC/mL).

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos comprovam que o azul de metileno apresenta resultados positivos como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica antimicrobiana. Além da eficiência, apresenta baixo custo quando comparado aos demais fotossensibilizadores disponíveis no mercado, e compatibilidade com fontes de luz comumente disponíveis em clínicas odontológicas, como o LED e o laser (Boltes Cecatto et al., 2020). O *gellan gum* é um exopolissacarídeo, biodegradável e biocompatível com capacidade de carreamento de fármacos (de Camargo Ribeiro et al., 2020). O *gellan gum* vem sendo estudado em diversas concentrações e tipos de formulação, como gel e beads, com a finalidade de atuar como sistema de entrega de fármacos em diferentes locais do corpo (Villarreal-Otalvaro, Coburn, 2021). Diante das propriedades do *gellan gum* como sistema de entrega e do azul de metileno como fotossensibilizador, este estudo propôs o uso do hidrogel de *gellan gum* como carreador do fotossensibilizador azul de metileno para aplicação na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *C. albicans*.

Neste estudo, verificou-se que o *gellan gum* foi capaz de incorporar e promover uma liberação controlada do fotossensibilizador azul de metileno. Os resultados demonstraram uma liberação mais rápida do fotossensibilizador na formulação de 0,6% (m/v) de *gellan gum* quando comparado ao hidrogel de 1,0% (m/v). No que diz respeito à concentração liberada pelas formulações, os resultados são condizentes com o trabalho de Garcia (2022) que utilizou o *gellan gum* como sistema de entrega do composto derivado da própolis, o ester fenetil do ácido cafeico (CAPE), para avaliar atividade antifúngica contra *C. albicans*. Foram desenvolvidas formulações de 0,6% a 1,0% (m/v) de *gellan gum* contendo o CAPE e avaliado o percentual de liberação (%) em decorrência do tempo. O *gellan gum* de concentração 0,6% (m/v) obteve pico de liberação do CAPE próximo de 100% nos primeiros 20 minutos de liberação, já o hidrogel de 1,0% (m/v) obteve no mesmo período de análise uma liberação próxima de 40% do composto. A relação entre aumento da concentração de *gellan gum* na formulação e consequente redução da liberação de compostos também foi observada no trabalho de Zheng et al. (2022) em que o corante vermelho do Nilo foi testado como modelo de liberação em emulsão mista de hidrogel

de *gellan gum* e quitosana. Esse corante apresentou maior porcentagem de liberação na formulação de 0,2% quando comparado ao de 0,8% no mesmo período de análise.

Nos testes de espectroscopia, o pico de absorção do *gellan gum* ocorreu na região próxima de 250 nm, tanto para o hidrogel de 0,6% como o de 1,0% (m/v), sendo esses resultados coincidentes com a literatura (Ismail et al., 2019). O azul de metileno em solução aquosa apresentou faixa de absorção entre 600 e 660 nm, com banda máxima de absorção na região de 660 nm, sendo estes valores também compatíveis com a literatura (Boltes Cecatto et al., 2020). Observou-se que o azul de metileno incorporado ao *gellan gum* manteve o pico de absorção em 660 nm, reforçando que a propriedade óptica de excitação do azul de metileno não foi afetada pelo seu carreamento em *gellan*. O pico de absorção na região de 660 nm, área de monômero, em ambos os hidrogéis e no azul de metileno aquoso (50µM) é indicativo de predomínio da reação do tipo II durante a terapia fotodinâmica.

Com relação ao teste do escudo óptico, notou-se que todos os grupos compostos por azul de metileno aquoso (50 µM) ou associado ao *gellan gum* de 0,6% e 1,0% (m/v) demonstraram redução na passagem da luz através do caminho óptico na cubeta (1 cm). Apesar da redução gradativa no percurso, todos os grupos apresentaram passagem de luz de forma semelhante, evidenciando que o *gellan gum* não impediu o feixe de laser pelo caminho óptico. Garcez e Hamblin (2017) testaram a interferência visual de diferentes concentrações de azul de metileno em meio aquoso na passagem de um feixe de laser. Esses autores indentificaram que as concentrações de 50 µM e 100 µM promoveram total passagem da luz no percurso óptico, já na concentração de 150 µM a passagem ocorreu até cerca da metade do percurso e em 300 µM o feixe de luz se manteve apenas no início do trajeto óptico.

Diante desses resultados, o azul de metileno incorporado em formulações de 0,6 e 1% de *gellan gum* foi testado na terapia fotodinâmica contra *C. albicans* em culturas planctônicas. Devido à ausência de documento específico para padronização de suspensões microbianas voltadas para testes de susceptibilidade antimicrobiana na terapia fotodinâmica, a suspensão padrão do teste em cultura planctônica foi adaptada da Norma M27-A2 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica Norma Aprovada - Segunda Edição), elaborado consensualmente pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI). Essa norma visa padronizar a suspensão

microbiana teste em concentração final de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mililitro (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002).

Partindo-se dessa concentração inicial de *C. albicans*, verificou-se uma redução microbiana de 3 log (UFC/mL) nos grupos TFD tratados com o *gellan gum* 0,6% e 1,0% (m/v) contendo azul de metileno (50 μ M) e o grupo azul de metileno aquoso (50 μ M). Estes resultados indicaram que o azul de metileno incorporado em hidrogéis de ambas as concentrações apresentou ação fotodinâmica semelhante ao grupo TFD com azul de metileno em solução aquosa. Tan et al. (2019) também encontraram redução de 3 log (UFC/mL) em cultura planctônica de isolados clínicos de *Candida auris*, resistentes ao fluconazol e caspofungina, após terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno aquoso em concentrações de 25, 50 e 100 μ M. Apesar da redução semelhante, vale ressaltar que os autores utilizaram parâmetros de irradiação diferentes dos empregados neste trabalho, tais como densidade de potência de 80 mW/cm² e tempo de irradiação de 120 segundos.

Ao evidenciarmos a eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelo sistema carreador de azul de metileno em *gellan gum*, sobre culturas planctônicas de *C. albicans*, este trabalho buscou avançar o estudo da TFD para biofilmes. A capacidade de formar biofilme é considerada um mecanismo de resistência de *C. albicans*, por potencializar a resistência desses microrganismos à diversos agentes antifúngicos devido à formação da matriz extracelular, bomba de efluxo e presença de células persistentes (Kaur, Nobile, 2023). Sendo assim, os biofilmes são formas sabidamente mais complexas e resistentes de *C. albicans* quando comparado com um cultivo planctônico.

No presente estudo, a aplicação da TFD sobre os biofilmes de *C. albicans* levou a redução de 1 log (UFC/mL) no grupo tratado com o AM aquoso (50 μ M) em relação ao controle não tratado, já os grupos contendo AM em *gellan gum* 0,6% e 1,0% (m/v) apresentaram reduções em torno de 0,5 log (UFC/mL). Por outro lado, de a et al. (2022) obtiveram redução de 2,9 log (UFC/mL) dos biofilmes de *C. albicans* após TFD mediada por azul de metileno aquoso (600 μ M) em concentrações superiores ao nosso estudo. Girollo et al. (2009) demonstram que em concentrações de 25 μ M a 1250 μ M de azul de metileno aquoso, a TFD apresentou forte atividade antimicrobiana contra crescimento de *C. albicans*. Entretanto, em concentrações superiores de AM a 1250 μ M a eficácia da TFD foi diminuída, provavelmente pelo

aumento do coeficiente de extinção luminosa do meio, impedindo a adequada irradiação da fonte de luz no espaço reacional.

Por fim, os resultados desse estudo demonstraram um efeito potencial do *gellan gum* em concentrações de 0,6% e 1,0% (m/v) como carreador do fotossensibilizador azul de metileno na terapia fotodinâmica antimicrobiana contra *C. albicans*. Em síntese, a formulação de *gellan gum* a 0,6% (m/v) demonstrou liberação mais rápida do fotossensibilizador quando comparada com a formulação de 1,0% (m/v). As atividades ópticas de ambas as formulações de *gellan gum* (0,6 e 1%) foram satisfatórias, mantendo a capacidade de absorbância do azul de metileno próximo de 660 nm, além de permitir a correta passagem da luz pelo percurso óptico. A ação antifúngica na TFD mediada pelas formulações de AM em *gellan gum* foi comprovada sobre *C. albicans* em ambos os estágios de crescimento planctônico e biofilmes.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com a característica de fotoinativação do azul de metileno preservada na associação com o *gellan gum* de 0,6% e 1,0%. O produto final sob formulação de hidrogel é uma forma de viabilizar a aplicação da terapia fotodinâmica em locais de difícil retenção e fácil escorrimento, como lábios e palato. Para aplicações futuras voltadas para a clínica odontológica, estudos adicionais ainda são necessários de forma a compreender os mecanismos envolvidos na fotoinativação das células de *Candida* pelo sistema azul de metileno em *gellan gum*, bem como a sua eficácia em modelos *in vivo* de experimentação.

7 CONCLUSÃO

As formulações de *gellan gum* 0,6% e 1,0% (m/v) foram capazes de incorporar o azul de metileno e posteriormente de liberar o fotossensibilizador em determinado intervalo de tempo.

O sistema carreador foi caracterizado conforme propriedades ópticas e demonstrou capacidade de passagem de luz e pico de absorção semelhante ao do fotossensibilizador.

Na terapia fotodinâmica, o hidrogel de *gellan gum* demonstrou ação antifúngica tanto em cultura planctônica com em biofilme maduro de 24 horas.

Conclui-se que o hidrogel carreador de azul de metileno a base de *gellan gum* foi capaz de manter as propriedades ópticas e de fotoinativação semelhantes ao do fotossensibilizador sob forma aquosa.

REFERÊNCIAS

- Alkatheri AH, Yap PS, Abushelaibi A, Lai KS, Cheng WH, Lim SE. Host-bacterial interactions: outcomes of antimicrobial peptide applications. *Membranes* (Basel). 2022 Jul 19;12(7):715. doi: 10.3390/membranes12070715. PMID: 35877918; PMCID: PMC9317001.
- Anuța V, Talianu MT, Dinu-Pîrvu CE, Ghica MV, Prisada RM, Albu Kaya MG, Popa L. Molecular mapping of antifungal mechanisms accessing biomaterials and new agents to target oral candidiasis. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 7;23(14):7520. doi: 10.3390/ijms23147520. PMID: 35886869; PMCID: PMC9320712.
- Baskaran R, Lee J, Yang SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res*. 2018 Sep 26;22:25. doi: 10.1186/s40824-018-0140-z. PMID: 30275968; PMCID: PMC6158913.
- Boltes Cecatto R, Siqueira de Magalhães L, Fernanda Setúbal Destro Rodrigues M, Pavani C, Lino-Dos-Santos-Franco A, Teixeira Gomes M, et al. Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human studies: the state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Sep;31:101828. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101828. Epub 2020 May 28. PMID: 32473398.
- Ribeiro FC, Junqueira JC, Dos Santos JD, de Barros PP, Rossoni RD, Shukla S, et al. Development of probiotic formulations for oral candidiasis prevention: gellan gum as a carrier to deliver *Lactobacillus paracasei* 28.4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 May 21;64(6):e02323-19. doi: 10.1128/AAC.02323-19. PMID: 32253208; PMCID: PMC7269487.
- Carobeli LR, Meirelles LEF, Damke GMZF, Damke E, Souza MVF, Mari NL, et al. Phthalocyanine and its formulations: a promising photosensitizer for cervical cancer phototherapy. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 2;13(12):2057. doi: 10.3390/pharmaceutics13122057. PMID: 34959339; PMCID: PMC8705941.
- Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys*. 2016 Dec;26(12):123001. doi: 10.1088/1054-660X/26/12/123001. Epub 2016 Nov 9. PMID: 29151775; PMCID: PMC5687295.
- Chen J, Fan T, Xie Z, Zeng Q, Xue P, Zheng T, et al. Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: status and challenges. *Biomaterials*. 2020 Apr;237:119827. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119827. Epub 2020 Jan 27. PMID: 32036302.
- Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014 Aug 12;5:405. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405. PMID: 25161649; PMCID: PMC4130309.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard Second Edition. Wayne: CLSI; 2002.

Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*. 2020 Jan 22;8(2):154. doi: 10.3390/microorganisms8020154. PMID: 31979032; PMCID: PMC7074842.

Das M, Giri TK. Hydrogels based on gellan gum in cell delivery and drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;56 Feb :101586. doi: 10.1016/j.jddst.2020.101586.

Dascalu Rusu LM, Moldovan M, Prodan D, Ciotlaus I, Popescu V, Baldea I, et al. Assessment and characterization of some new photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). *Materials (Basel)*. 2020 Jul 6;13(13):3012. doi: 10.3390/ma13133012. PMID: 32640635; PMCID: PMC7372345.

Dereje DM, Pontremoli C, Moran Plata MJ, Visentin S, Barbero N. Polymethine dyes for PDT: recent advances and perspectives to drive future applications. *Photochem Photobiol Sci*. 2022 Mar;21(3):397-419. doi: 10.1007/s43630-022-00175-6. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35103979.

Drzewiecka-Matuszek A, Rutkowska-Zbik D. Application of TD-DFT theory to studying porphyrinoid-based photosensitizers for photodynamic therapy: a review. *Molecules*. 2021;26(23):7176. doi: 10.3390/molecules26237176.

Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Topics*. 2010;22(1):2–16. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x.

Eduardo C de P, Bello-Silva MS, Ramalho KM, Lee EMR, Aranha ACC. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2015;69(3):226–35.

Escolà-Vergé L, Los-Arcos I, Almirante B. New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2020;154(9):351–7. doi: 10.1016/j.medcle.2019.11.005.

Figueiredo-Godoi LMA, Menezes RT, Carvalho JS, Garcia MT, Segundo AG, Jorge AOC, et al. Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Sep;27:66-73. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.010. Epub 2019 May 14. PMID: 31100446.

Frade ML, de Annunzio SR, Calixto GMF, Victorelli FD, Chorilli M, Fontana CR. Assessment of chitosan-based hydrogel and photodynamic inactivation against *propionibacterium acnes*. *Molecules*. 2018;23(2). doi: 10.3390/molecules23020473.

Gao W, Zhu Y, Ye J, Chu H. Gut non-bacterial microbiota contributing to alcohol-associated liver disease. *Gut Microbes*. 2021;13(1). doi: 10.1080/19490976.2021.1984122.

Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghashtanli NA, Itri R, Hamblin MR, et al. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 Apr;10(4):483-90. doi: 10.1039/c0pp00082e. Epub 2010 Dec 2. PMID: 21125123; PMCID: PMC3069140.

Garcez AS, Hamblin MR. Methylene blue and hydrogen peroxide for photodynamic inactivation in root canal - a new protocol for use in endodontics. *Eur Endod J*. 2017;2(1):29–29. doi: 10.5152/eej.2017.17023.

Garcez AS, Roque JA, Murata W, Hamblin M. Uma nova estratégia para PDT antimicrobiana em endodontia. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2016;70(2):126–30.

Garcia MT. Novas estratégias terapêuticas para o controle de biofilmes orais: terapia fotodinâmica e sistema carreador de antimicrobianos [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Girolardo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009;24(1):109–12. doi: 10.1007/s10103-007-0530-2.

Hao Y, Chung CK, Yu Z, Huis in 't Veld R v., Ossendorp FA, ten Dijke P, et al. Combinatorial therapeutic approaches with nanomaterial-based photodynamic cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(1):120. doi: 10.3390/pharmaceutics14010120.

Hou W, Shi G, Wu S, Mo J, Shen L, Zhang X, et al. Application of fullerenes as photosensitizers for antimicrobial photodynamic inactivation: a review. *Front Microbiol*. 2022 Jul 14;13:957698. doi: 10.3389/fmicb.2022.957698. PMID: 35910649; PMCID: PMC9329950.

Ismail N, Mat Amin K, Razali M. Antibacterial study of gellan gum (GG) film incorporated norfloxacin. *J Pure Appl Microbiol*. 2019;13(2):1095–102. doi: 10.22207/JPAM.13.2.48.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):468–81. doi: 10.1002/lsm.20361.

Junqueira M v, Borghi-Pangoni FB, Ferreira SBS, Rabello BR, Hioka N, Bruschi ML. Functional polymeric systems as delivery vehicles for methylene blue in photodynamic therapy. *Langmuir*. 2016;32(1):19–27. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b02039.

Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2023;71:102237. doi: 10.1016/j.mib.2022.102237.

Keighley C, Garnham K, Harch SAJ, Robertson M, Chaw K, Teng JC, et al. *Candida auris*: diagnostic challenges and emerging opportunities for the clinical microbiology laboratory. *Curr Fungal Infect Rep*. 2021; doi: 10.1007/s12281-021-00420-y.

Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30119176.

Lan M, Zhao S, Liu W, Lee CS, Zhang W, Wang P. Photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(13):1–37. doi: 10.1002/adhm.201900132.

de Lapena SAB, Terra-Garcia M, Ward RA da C, Rossoni RD, Melo VMM, Junqueira JC. Enhancing effect of chitosan on methylene blue-mediated photodynamic therapy against *C. albicans*: A study in planktonic growth, biofilms, and persister cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;38:102837. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102837.

Leung B, Dharmaratne P, Yan W, Chan BCL, Lau CBS, Fung KP, et al. Development of thermosensitive hydrogel containing methylene blue for topical antimicrobial photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2020 Jan;203:111776. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111776. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31931388.

Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J*. 2017;223(9):675–81. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886.

Li G, Wang Q, Liu J, Wu M, Ji H, Qin Y, et al. Innovative strategies for enhanced tumor photodynamic therapy. *J Mater Chem B*. 2021;9(36):7347–70. doi: 10.1039/D1TB01466H.

Lin CC, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(12–13):1379–408. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.004.

Lin S, Liu C, Han X, Zhong H, Cheng C. Viral nanoparticle system: An effective platform for photodynamic therapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1–15. doi: 10.3390/ijms22041728.

Logan A, Wolfe A, Williamson JC. Antifungal resistance and the role of new therapeutic agents. *Curr Infect Dis Rep*. 2022; doi: 10.1007/s11908-022-00782-5.

Lorenzo G, Zaritzky N, Califano A. Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. *Food Hydrocoll*. 2013;30(2):672–80. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.08.014.

Lu SY. Oral candidosis: pathophysiology and best practice for diagnosis, classification, and successful management. *J Fungi (Basel)*. 2021 Jul 13;7(7):555. doi: 10.3390/jof7070555. PMID: 34356934; PMCID: PMC8306613.

Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev*. 2015;115(4):1990–2042. doi: 10.1021/cr5004198.

Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 2016 Jul-Aug;34(4):487-94. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022. Epub 2016 Mar 2. PMID: 27343964.

Mokwena MG, Kruger CA, Ivan MT, Heidi A. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Jun;22:147-154. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.03.006. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29588217.

Monika S, Malgorzata B, Zbigniew O. Contribution of aspartic proteases in candida virulence. *Protease Inhibitors against Candida Infections. Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(10). doi: 10.2174/1389203717666160809155749.

Muthukumar T, Song JE, Khang G. Biological role of gellan gum in improving scaffold drug delivery, cell adhesion properties for tissue engineering applications. *Molecules*. 2019;24(24). doi: 10.3390/molecules24244514.

Oliveira Cardoso VM de, Stringhetti Ferreira Cury B, Evangelista RC, Daflon Gremião MP. Development and characterization of cross-linked gellan gum and retrograded starch blend hydrogels for drug delivery applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017;65:317–33. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.08.005.

Osmalek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm*. 2014;466(1–2):328–40. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.038.

Palumbo FS, Federico S, Pitarresi G, Fiorica C, Giammona G. Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydr Polym*. 2020;229:115430. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115430.

Patel M. Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the development of infection. *Pathogens*. 2022;11(3):335. doi: 10.3390/pathogens11030335.

Pinto JG, Martins JFS, Pereira AHC, Mittmann J, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:325-330. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.04.009. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28457848.

Ribeiro JN, Jorge RA, Silva AR da, Flores A v., Ronchi LM, Tedesco AC. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclet Quím*. 2007;32(1):7–14. doi: 10.1590/S0100-46702007000100001.

Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Carnero-Gregorio M, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Fida M, et al. Pathogenesis and clinical relevance of candida biofilms in vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol.* 2020;11. doi: 10.3389/fmicb.2020.544480.

dos Santos JD, Fugisaki LR de O, Medina RP, Scorzoni L, Alves M de S, de Barros PP, et al. *Streptococcus mutans* secreted products inhibit *Candida albicans* induced oral candidiasis. *Front Microbiol.* 2020;11. doi: 10.3389/fmicb.2020.01605.

Satala D, Gonzalez-Gonzalez M, Smolarz M, Surowiec M, Kulig K, Wronowska E, et al. The role of *Candida albicans* virulence factors in the formation of multispecies biofilms with bacterial periodontal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 5;11:765942. doi: 10.3389/fcimb.2021.765942. PMID: 35071033; PMCID: PMC8766842.

Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022;0123456789. doi: 10.1038/s41579-022-00767-0.

Schaeffer B, D'Aviz FS, Ghiggi PC, Klassmann LM. Terapia fotodinâmica na endodontia: revisão de literatura TT - Photodynamic therapy in endodontics: literature review. *J Oral Investig.* 2019;8(1):86–99.

Silvestre ALP, Di Filippo LD, Besegato JF, de Annunzio SR, de Camargo BAF, de Melo PBG, et al. Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. *Int J Pharm.* 2021 Jan 5;592:120078. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120078. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33189809.

Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova.* 2002;25(5):801–7. doi: 10.1590/S0100-40422002000500016.

Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans* - the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J fungi.* 2021;7(2):79. doi: 10.3390/jof7020079.

Tan J, Liu Z, Sun Y, Yang L, Gao L. Inhibitory effects of photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida auris*. *Mycopathologia.* 2019;184(4):525–31. doi: 10.1007/s11046-019-00352-9.

Tardivo JP, del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(3):175–91. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.

Tisoco I, Donatoni MC, Victória HFV, de Toledo JR, Krambrock K, Chaves OA, et al. Photophysical, photooxidation, and biomolecule-interaction of meso-tetra(thienyl)porphyrins containing peripheral Pt(II) and Pd(II) complexes. Insights for

photodynamic therapy applications. *Dalton Trans.* 2022 Jan 25;51(4):1646-1657. doi: 10.1039/d1dt03565g. PMID: 35015799.

Tortorano AM, Prigitano A, Morroni G, Brescini L, Barchiesi F. Candidemia: evolution of drug resistance and novel therapeutic approaches. *Infect Drug Resist.* 2021 Dec 19;14:5543-5553. doi: 10.2147/IDR.S274872. PMID: 34984009; PMCID: PMC8702982.

Vara J , Gualdesi MS , Aiassa V , Ortiz CS . Evaluation of physicochemical properties and bacterial photoinactivation of phenothiazine photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* 2019 Jun 12;18(6):1576-1586. doi: 10.1039/c8pp00584b. PMID: 31066390.

Varzandeh M, Mohammadinejad R, Esmaeilzadeh-Salestani K, Dehshahri A, Zarrabi A, Aghaei-Afshar A. Photodynamic therapy for leishmaniasis: recent advances and future trends. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Dec;36:102609. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102609. Epub 2021 Oct 31. PMID: 34728420.

Vera C, Tulli F, Borsarelli CD. Photosensitization with supramolecular arrays for enhanced antimicrobial photodynamic treatments. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9(July):1–8. doi: 10.3389/fbioe.2021.655370.

Verger A, Brandhonneur N, Molard Y, Cordier S, Kowouvi K, Amela-Cortes M, et al. From molecules to nanovectors: Current state of the art and applications of photosensitizers in photodynamic therapy. *Int J Pharm.* 2021;604(March):120763. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120763.

Villarreal-Otalvaro C, Coburn JM. Fabrication methods and form factors of gellan gum-based materials for drug delivery and anti-cancer applications. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021;acsbiomaterials.1c00685. doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00685.

Wang S, Wang X, Yu L, Sun M. Progress and trends of photodynamic therapy: from traditional photosensitizers to AIE-based photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Jun;34:102254. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102254. Epub 2021 Mar 10. PMID: 33713845.

Wiench R, Skaba D, Matys J, Grzech-Leśniak K. Efficacy of toluidine blue—mediated antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* spp. a systematic review. *Antibiotics.* 2021;10(4):349. doi: 10.3390/antibiotics10040349.

Xiao Y, Chen W-C, Chen J-X, Lu G, Tian S, Cui X, et al. Amplifying free radical generation of aie photosensitizer with small singlet–triplet splitting for hypoxia-overcoming photodynamic therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;acsami.1c23797. doi: 10.1021/acsami.1c23797.

Yan E, Kwek G, Qing NS, Lingesh S, Xing B. Antimicrobial photodynamic therapy for the remote eradication of bacteria. *Chempluschem.* 2023;88(3). doi: 10.1002/cplu.202300009.

Yoneda JS, de Araujo DR, Sella F, Liguori GR, Liguori TTA, Moreira LFP, et al. Self-assembled guanosine-hydrogels for drug-delivery application: structural and mechanical characterization, methylene blue loading and controlled release. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Feb;121:111834. doi: 10.1016/j.msec.2020.111834. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33579472.

Youf R, Müller Max, Balasini A, Thétiot F, Müller Mareike, Hascoët A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: latest developments with a focus on combinatory strategies. *Pharmaceutics*. 2021;13(12):1995. doi: 10.3390/pharmaceutics13121995.

Younis MR, He G, Qu J, Lin J, Huang P, Xia XH. Inorganic nanomaterials with intrinsic singlet oxygen generation for photodynamic therapy. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Nov;8(21):e2102587. doi: 10.1002/advs.202102587. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34561971; PMCID: PMC8564446.

Zheng W, Zhang H, Wang Ju, Wang Jinjin, Yan L, Liu C, et al. Pickering emulsion hydrogel based on alginate-gellan gum with carboxymethyl chitosan as a pH-responsive controlled release delivery system. *Int J Biol Macromol*. 2022;216:850–9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.223.

Zhou Y, Liao M, Zhu C, Hu Y, Tong T, Peng X, et al. ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of *Candida albicans* during the oral mucosal infection. *Int J Oral Sci*. 2018 Mar 16;10(2):9. doi: 10.1038/s41368-018-0013-2. PMID: 29555898; PMCID: PMC5944255.

Zhou Z, Zhang L, Zhang Z, Liu Z. Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. *Asian J Pharm Sci*. 2021;16(6):668–86. doi: 10.1016/j.ajps.2020.12.003.

Zia KM, Tabasum S, Khan MF, Akram N, Akhter N, Noreen A, et al. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *Int J Biol Macromol*. 2018;109:1068–87. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099.