

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/03/2023.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Tábata Viana de Sousa

**O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em
biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Tábata Viana de Sousa

O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de
Odontologia, Araraquara para
obtenção do título de Mestre em
Reabilitação Oral

Orientador: Prof^a Dra^a Ana Cláudia Pavarina

Araraquara

2022

S725p

Sousa, Tábata Viana de

O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol / Tábata Viana de Sousa. -- Araraquara, 2022
78 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Ana Cláudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia. 2. *Candida albicans*. 3. Peróxido de Hidrogênio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Tábata Viana de Sousa

O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan

3º Examinador: Profa. Dra. Natália Mayumi Inada

4º Examinador: Profa. Dra. Janaína Habib Jorge

5º Examinador: Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek

Araraquara, 07 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Tábata Viana de Sousa

NASCIMENTO: 11/09/1996- Ribeirão Preto, São Paulo

FILIAÇÃO: Márcia Flores Viana de Sousa
Carlos Alberto Fernandes de Sousa

2015 – 2019: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2016 – 2017: Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2017 – 2018: Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2018 – 2019: Estágio de Iniciação Científica no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, área de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr- Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

2021– 2021: Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”-UNESP.

2020 – 2022: Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a **Deus**, que me manteve forte em todo o período de graduação, pós-graduação e me ajudou a passar por todos os momentos, mesmo quando tudo parecia tão difícil, ele me deu forças para continuar a trilhar esse caminho da pós-graduação, que não foi fácil, mas foi muito gratificante e só foi possível graças a ele.*

*Agradeço imensamente aos meus pais **Carlos e Márcia**, que não mediram esforços para me ajudar e me apoiar, e em todos os momentos estiveram comigo, me aconselhando, comemorando e vivendo essa etapa sempre juntos, agradeço pelas inúmeras vezes que me buscaram em Araraquara, e por deixarem suas prioridades de lado para me dar a oportunidade de viver o meu sonho. Vocês foram essenciais para esse trabalho existir, sem vocês eu não teria conseguido. Obrigado por tudo, amo vocês!*

*Agradeço a minha irmã **Thauany** que sempre esteve comigo, que foi e é minha companheira de vida, que participou de todos os momentos, me ouviu apresentar os trabalhos inúmeras vezes, mesmo sendo jovem para entender alguns conceitos, sempre ouviu até o final das apresentações. Obrigada por todas as ligações, conversas e carinho. Te amo!*

*Agradeço o meu namorado **Felipe Henrique** pela paciência que teve nesses dois anos, quando eu estava preocupada, obrigada por sempre me ouvir e me dar conselhos. Obrigada por ficar comigo em Araraquara nos finais de semana, me esperando até tarde. Você foi muito importante nesse período, e obrigada por deixar minha vida mais leve. Amo você.*

*Meu eterno agradecimento a minha orientadora **Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina**, que esteve comigo desde o meu segundo ano de graduação até o fim do mestrado, eu não seria a profissional que sou hoje se não tivesse o seu apoio. Sou muito grata por sua orientação, ensinamentos, carinho e conselhos, muito obrigada por acreditar em mim, e por todos esses anos me orientando nessa jornada.*

*Agradeço a minha companheira de laboratório e amiga, **Cláudia Jordão** que me ensinou muito, e me ajudou em todos os momentos que precisei, obrigada por*

todos os conselhos, risadas e dicas, você deixou essa jornada muito mais leve, serei eternamente grata por tudo.

*Agradeço aos meus amigos que estiveram comigo, nesse período, **Amanda Bellini, César Abreu, Vitória Bonan, Luana Dias, Ana Luíza e a todos os colegas de laboratório**, obrigada por todos os momentos juntos, risadas e companheirismo, vocês deixaram essa caminhada muito mais leve e divertida.*

*Agradeço aos demais professores do **Departamento de Materiais Dentários e Prótese** por todos os ensinamentos durante todo esse período que estive na Unesp-FOAR, todos foram essenciais para me tornar a profissional que sou hoje.*

*À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)** que foi minha segunda casa por tantos anos, me tornou a profissional que sou hoje. Lá eu pude realizar o meu sonho, e conheci pessoas incríveis. Minha eterna gratidão a essa instituição de ensino incrível e tão acolhedora.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr/UNESP, por toda contribuição nesse período.*

*Aos professores membros da banca **Profa. Dra. Natália Mayumi Inada, Profa. Dra. Marlise Inêz Klein Furlan**, pela disponibilidade em estar presente e por toda contribuição com seus ensinamentos. Obrigada!*

*Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior– Brasil (CAPES)** pela bolsa de Mestrado concedida no período de março/2020 a março/2022. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.*

*Agradeço ao **Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID- FAPESP-2013/07276-1)** pelo apoio oferecido no desenvolvimento dessa pesquisa.*

*Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2020/09332-0)** pelo apoio financeiro na aquisição de materiais essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa.*

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho, muito obrigada!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.”

Cora Coralina *

*CORALINA C. Vintém de cobre: Meias confissões de Aninha. São Paulo: Global Editora; 1997.

Sousa TV. O peróxido de hidrogênio aumenta a eficácia da terapia fotodinâmica em biofilmes de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Candida albicans e a matriz são componentes fundamentais para o desenvolvimento de biofilmes, e os ensaios devem visar ambos os componentes. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) combinado à terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), mediada por Photodithazine® (P) e LED (L) sobre biofilme de *Candida albicans* sensível ao fluconazol (CaS) ATCC 90028 e resistente (CaR) ATCC 96901. Os biofilmes foram cultivados por 48 horas e foram expostos a H_2O_2 (10mM) por 5 min, seguido pela aplicação de P e L isoladamente ou combinados (H_2O_2 +P+L+, H_2O_2 +P-L+, H_2O_2 , P+L+, PL -, P+L-, P-L+; n=12). Após o tratamento, os biofilmes foram avaliados por unidade formadora de colônia/mL, componentes da matriz extracelular [polissacarídeos solúveis em água (WSP) e em álcali (ASP), proteínas, eDNA], biomassa (total e insolúvel) e proteínas. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi realizada. Os dados foram analisados por um teste ANOVA de três vias com o teste post-hoc de Bonferroni. A exposição dos biofilmes a 10 mM de H_2O_2 por 5 minutos seguido de aPDT reduziu as proteínas solúveis e insolúveis da matriz, eDNA, ASP, WSP e o peso seco insolúvel e solúvel dos biofilmes de CaS e de CaR. A MEV revelou redução no número de células do biofilme e dispersão das hifas do grupo H_2O_2 +P+L+ em relação ao P-L- (controle). Em suma, a associação com H_2O_2 aumentou a eficácia da aPDT e reduziu os componentes da matriz extracelular do biofilme; logo essa associação se mostra promissora para possíveis aplicações in vivo, já que in vitro foi obtido resultados bastante satisfatórios.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. *Candida albicans*. Peróxido de hidrogênio.

Sousa TV. Hydrogen peroxide enhances the efficacy of photodynamic therapy against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* biofilms [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Candida albicans and matrix are essential for the development of biofilms, and assays should therefore target both components. The aim of this study was evaluated the effectiveness of the hydrogen peroxide (H_2O_2) combined with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), mediated by Photodithazine® (P) and LED (L) on biofilms formed by fluconazole susceptible (CaS) and resistant (CaR) *Candida albicans* strains. Biofilms were grown for 48 hours and were exposed to H_2O_2 (10mM) for 5 min, followed by application of P and L either singly or combined (H_2O_2 +P+L+, H_2O_2 +P-L+, H_2O_2 , P+L+, P-L-, P+L-, P-L+; n=12). After the treatment, biofilms were evaluated by colony-forming unit/mL, extracellular matrix components [polysaccharides soluble in water (WSP) and in alkali (ASP), proteins, eDNA,], biomass (total and insoluble) and proteins. Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed. The data were analyzed by a three-way ANOVA test with Bonferroni's post-hoc test. In both strains, the treatment of biofilms with 10 mM H_2O_2 for 5 minutes followed by aPDT reduced soluble and insoluble matrix proteins, eDNA, ASP, WSP and insoluble and soluble dry weight of CaS and CaR biofilms. SEM revealed a reduction in the number of biofilm cells and hyphae dispersion in the H_2O_2 +P+L+ group in relation to the P-L- (control). In short, the association with H_2O_2 increased the effectiveness of aPDT and reduced the extracellular matrix components of the biofilm; therefore, this association shows promise for possible applications in vivo, since in vitro results were promissory.

Keywords: Photochemotherapy. *Candida albicans*. Hydrogen peroxide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	16
3 PUBLICAÇÃO	17
3.1 Publicação 1	17
4 CONCLUSÃO	47
5 REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A	51
APÊNDICE B	64

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo comensal presente na microbiota da cavidade oral e em outros locais do corpo humano¹⁻³. Em situações de desequilíbrio do sistema imunológico, esse fungo pode causar infecções devido à sua grande capacidade de adaptação a diferentes nichos no hospedeiro³. *C. albicans* tem sido associado a manifestações clínicas de infecção que variam desde lesões mucocutâneas superficiais, como Candidose Orofaríngea (OPC), até formas disseminadas da infecção^{4,5}. A virulência desse fungo está associada à sua capacidade de formar biofilmes que são comunidades organizadas de células incorporadas em uma matriz de polímeros extracelulares⁶.

Para o tratamento da OPC, alguns medicamentos de aplicações tópica, sistêmica, tais como os derivados azóis, poliênicos e as equinocandinas tem sido encontrado no mercado^{7,8}. Os azóis tem a função de inibir a produção de ergosterol, o que pode levar a instabilidade na membrana, já os poliênicos se ligam ao ergosterol na membrana celular fúngica, levando à lise celular; e, as equinocandinas inibem a biossíntese da parede celular dos fungos, o que gera danos à mesma⁹. A medicação sistêmica tem sido utilizada com frequência em indivíduos com saúde geral comprometida e também em episódios de infecções recorrentes, utilizando medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B¹⁰. Porém, a utilização indiscriminada de antifúngicos tópicos ou sistêmicos para o tratamento da OPC tem resultado no desenvolvimento de resistência em espécies de *Candida*. A tolerância antifúngica dos biofilmes de *Candida* é multifatorial e está associada à estimulação de bombas de efluxo de fármacos, ao estado fisiológico das células e a proteção exercida pela MEC por meio de β -glucanos que se ligam ao fluconazol e à anfotericina B^{11,12}. O polissacarídeo β -1,3 glucano tem sido associado ao mecanismo de resistência^{13,14}. Além do β -glucano, foi relatado que o DNA extracelular (eDNA) também é um constituinte importante da MEC e promove integridade estrutural dos biofilmes e ambos atuam na proteção do biofilme bacteriano contra difusão de antibióticos^{15,16}. Levando em consideração o aumento na incidência de patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais e a toxicidade dos medicamentos utilizados, estudos têm buscado estratégias para inviabilização de microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais.

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido avaliada para a inativação de microrganismos¹⁷. Para que ocorra o processo fotodinâmico é necessária a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio^{17,18}. Primeiramente, a célula-alvo é tratada com o FS, em um processo chamado fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para ocorrer a iluminação do alvo sensibilizado. A combinação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular¹⁷. Esse mecanismo faz com que tenha a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas¹⁷. Os dois caminhos podem levar a morte celular do microrganismo^{17,18}. Hoje em dia vem sendo empregada em aPDT, os FS de segunda geração. Dentre estes compostos estão as clorinas, porfirinas hidrofílicas que apresentam elevada banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine® (PDZ) é uma clorina e6, solúvel em água que apresenta um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete¹⁹. Ele apresenta alta banda de absorção no espectro eletromagnético (650 a 680 nm), o que o permite atravessar com maior profundidade as membranas biológicas, melhorando a ação da terapia fotodinâmica¹⁹.

A aPDT mediada pelo PDZ gerou uma redução significativa na viabilidade de culturas planctônicas de *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após esse tratamento. Ao avaliar o biofilme, aPDT promoveu redução na viabilidade celular equivalente a 0,9 log₁₀ (UFC/mL) para *C. albicans* e 1,4 e 1,5 log₁₀ (UFC/mL) para *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente²⁰. Outro estudo, utilizando modelo murino de candidose, avaliou a eficácia da aPDT, mediada pelo PDZ e LED na inativação de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC e isolados clínicos)²¹. A aPDT promoveu redução na ordem de 1,15 a 1,96 log₁₀, dependendo da cepa avaliada (R15, ATCC 96901, respectivamente), já na outra cepa (R10) não houve decréscimo na quantidade de UFC, logo foi menos susceptível à aPDT. Quando os animais foram tratados durante cinco dias consecutivos com aPDT (100mg/L de PDZ com LED) ou com antifúngico tópico

Nistatina (NIS), a aPDT foi bastante efetiva na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 log₁₀, respectivamente. Além disso, os animais tratados com aPDT resultaram em remissão completa das lesões orais, já quando os animais foram tratados com Nistatina houve remissão parcial das mesmas²². Em outro estudo²³ utilizando o mesmo modelo murino de infecção foi observado que a cepa resistente ao fluconazol (ATCC 96901) foi menos susceptível à aPDT uma vez que a redução de *C. albicans* observada nos animais tratados com aPDT ou NIS foi de 1,3 e 1,1 log₁₀, respectivamente, enquanto o aspecto macroscópico da lesão permaneceu igual aos animais que não receberam tratamento. Quando as terapias foram associadas, a redução no número de colônias foi mais acentuada, equivalente a 2,6 e 2,1 log₁₀, para os grupos NIS+aPDT e aPDT+NIS, respectivamente, e foi observada remissão da lesão em aproximadamente 90%, 24 horas após o tratamento (em comparação ao grupo controle). De maneira geral, os estudos citados^{22,23} demonstraram a susceptibilidade das espécies de *Candida spp.* à aPDT em biofilme, entretanto, a completa inativação das células fúngicas não ocorreu. A sobrevivência desses microrganismos pode ser atribuída à complexa estrutura dos biofilmes, fornecendo proteção aos mesmos e resistência aos fármacos, o que torna os biofilmes de *Candida spp.* menos susceptíveis à aPDT quando comparados com culturas planctônicas. Além disso, cepas resistentes ao fluconazol também são menos susceptíveis ao tratamento fotodinâmico²⁴.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é usado mundialmente para limpar feridas, remover tecido morto ou como agente debridante oral, devido às suas propriedades oxidantes²⁵. A resposta de *C. albicans* ao estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ indicou a formação de biofilme com uma matriz polimérica extracelular espessa com níveis aumentados de polissacarídeos e eDNA na matriz de biofilme²⁶. Por outro lado, a utilização de H₂O₂ poderia potencializar o efeito da aPDT. A combinação do FS azul de metileno (60 µM) e H₂O₂ (100 mM) melhora a eficácia da aPDT em culturas planctônicas de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) e fungo (*C. albicans*). Segundo os autores Garcez et al.²⁵, utilizar o H₂O₂ antes do tratamento fotodinâmico ou adicionar o FS na solução de H₂O₂ melhora a absorção do FS pelo microrganismo e potencializa a morte microbiana²⁵. A associação destas duas substâncias também foi efetiva na inativação de culturas planctônicas e na inibição de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (até 57% de redução de biomassa utilizando 250 mM de azul de metileno dissolvido em 100 mM de H₂O₂)²⁷. A utilização da

clorexidina ou H_2O_2 associada a aPDT (azul de toluidina a 100 $\mu\text{g/mL}$) foi mais eficaz na erradicação de *S. aureus* em discos titânio em comparação com quaisquer dos tratamentos isoladamente²⁸ e o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, seguido da aPDT (riboflavina + LED) aumentou a morte de bactérias periodontopatogênicas em suspensão e reduziu as contagens bacterianas em modelo de biofilme²⁹. Por outro lado, a associação de peróxido de hidrogênio com a nanopartícula de β -ciclodextrina conjugada como FS não resultou em um efeito intensificado da aPDT sobre o *S. mutans*³⁰. Segundo os autores, o estresse oxidativo promovido pelo H_2O_2 pode alterar a estrutura do biofilme, favorecendo a penetração de FS e luz nos níveis mais profundos do biofilme. Além disso, as ROS produzidas pelo peróxido de hidrogênio podem sensibilizar células e componentes da matriz para que fiquem mais suscetíveis à explosão de ROS da aPDT. No entanto, essa suposição precisa ser investigada, uma vez que não há relatos até o momento de estudos que avaliaram o efeito do H_2O_2 associado à aPDT na matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans*. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a aplicação de H_2O_2 pode potencializar a ação da aPDT (mediada por PDZ e LED) em biofilmes suscetíveis (ATCC 90028) e resistentes ao fluconazol (ATCC 96901).

4 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados foi possível concluir que:

O peróxido de hidrogênio (10 mM) aplicado por 5 minutos seguido de aPDT afetou os componentes da matriz extracelular e reduziu a viabilidade celular dos biofilmes de CaS e CaR. Houve redução das proteínas solúveis e insolúveis, eDNA, ASP, WSP e o peso seco insolúvel e solúvel de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol. Assim o H₂O₂ potencializou o efeito antimicrobiano da aPDT.

REFERÊNCIAS*

- 1- Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016; 18(5): 310-21.
- 2- Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5;5(4): 01333-14.
- 3- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi A, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products, and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1): 10-24.
- 4- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002; 78(922): 455-9.
- 5- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(11): 685-702.
- 6- Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012; 148(1-2): 126-38.
- 7- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi A, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products, and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1): 10-24.
- 8- Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3): 283-8.
- 9- Taff HT, Mitchell KF, Edward JÁ, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Futur Microbiol.* 2013, 8(10): 1325-37.
- 10- Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2005; 93(3): 288-93.
- 11- Kragh KN, Alhede M, Rybtke M, Stavnsberg C, Jensen PØ, Tolker-Nielsen T et al. The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 14(7): 85-95.
- 12- Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(9): 3259-66.
- 13- Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B et al. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(2): 510-20.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- 14-Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(5): 2096-111.
- 15-Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog*. 2008; 4(11); e1000213.
- 16--Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 85-105.
- 17-Hamblin MR, Abrahamse H. Can light-based approaches overcome antimicrobial resistance? *Drug Dev Res*. 2019; 80(1): 48-67.
- 18-Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163(1):1-12.
- 19--Banfi SCE, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, Gariboldi M et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12(8), 4853-60.
- 20-Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013; 29(9):1057-67.
- 21-Alves F, Carmello JC, Mima EGO, Costa CAS, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo. *Med Mycol*. 2018; 57(5): 609-17.
- 22-Carmello JC, Alves F, G. Basso F, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EGO. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®- mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS ONE*. 2016; 11(6): e0156947.
- 23- Hidalgo KJR, Carmello JC, Jordão CC, Barbugli PA, de Sousa Costa CA, Mima EGO, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy in combination with Nystatin in the treatment of experimental oral candidiasis induced by *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12(3): 140.
- 24-Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2001; 144(2): 274–8.
- 25-Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghasanli NA, Itri R, Hamblin MR et al. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol Sci*. 2011; 10(4): 483–90.
- 26- Pemmaraju SC, Padmapriya K, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. Impact of oxidative and osmotic stresses on *Candida albicans* biofilm formation. *Biofouling*. 2016; 32(8): 897-909.
- 27- Yang SM, Lee DW, Park HJ, Kwak MH, Park JM, Choi MG. Hydrogen peroxide enhances the antibacterial effect of methylene blue-based photodynamic therapy on biofilm-forming bacteria. *Photochem Photobiol*. 2019; 95(3): 833-8.
- 28-Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Mar; 25: 382-8.

- 29-Kunz D , Wirth J , Sculean A, Eick S. In- vitro-activity of additive application of hydrogen peroxide in antimicrobial photodynamic therapy using LED in the blue spectrum against bacteria and biofilm associated with periodontal disease. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019 Jun; 26:306-12.
- 30-Sales LS, Guimarães GN, Wijesinghe GK, Moreira KMS, Joia F, Stipp RN et al.. Addition of hydrogen peroxide to methylene blue conjugated to β cyclodextrin in photodynamic antimicrobial chemotherapy in *S. mutans* biofilm. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019 Dec; 28: 226-33.