



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



Nathália dos Santos Fusco

**Potencial da associação de peptídeos antimicrobianos com inativação
fotodinâmica contra *Candida albicans***

Araraquara

2022



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



Nathália dos Santos Fusco

**Potencial da associação de peptídeos antimicrobianos com inativação
fotodinâmica contra *Candida albicans***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Livia Nordi Dovigo

Araraquara

2022

F993p

Fusco, Nathália dos Santos

Potencial da associação de peptídeos antimicrobianos com inativação fotodinâmica contra *Candida albicans* / Nathália dos Santos Fusco. -- Araraquara, 2022
110 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Profª Drª Livia Nordi Dovigo

1. *Candida albicans*. 2. Resistência microbiana a medicamentos. 3. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. 4. Fotoquimioterapia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Nathália dos Santos Fusco

**Potencial da associação de peptídeos antimicrobianos com inativação
fotodinâmica contra *Candida albicans***

Comissão Julgadora

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Área de
Reabilitação Oral**

Presidente e orientadora: Prof^a Dr^a Lívia Nordi Dovigo

2º Examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3º Examinador: Prof^a Dr^a Natalia Mayumi Inada

Araraquara, 08 de junho de 2022

Dados Curriculares

Nathália dos Santos Fusco

NASCIMENTO: 29 de junho de 1998 – Marília – São Paulo

FILIAÇÃO: Elaine Cristina dos Santos Fusco
Elito Fusco

2016/2019: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru/São Paulo.

2020 – em andamento: Curso de Pós-graduação em Odontologia, com área em Reabilitação Oral, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, Araraquara/São Paulo.

2021: Estágio de docência na Disciplina de Metodologia Científica, para o curso de Odontologia, com supervisão da Profª Drª Lívia Nordi Dovigo.

2021: Estágio de docência na Disciplina de Prótese Fixa Convencional e sobre Implantes, para o curso de Odontologia, com supervisão do Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis.

Dedico esta dissertação com todo meu amor aos meus queridos pais, Elaine e Elito. Sem eles nenhuma conquista da minha vida teria acontecido. Os dois que são minha base e minha força para ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter aberto caminhos para que eu pudesse trilhar essa caminhada de tantos aprendizados e conquistas.

Gratidão aos meus pais, que me acompanharam e me ampararam ao longo desses anos e que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos.

Agradeço a minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Livia Dovigo, por ter me auxiliado mesmo que durante a pandemia de COVID-19, para que eu pudesse finalizar este trabalho de uma forma majestosa.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº2020/10200-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À CAPES: 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 Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho, que colaborou imensamente nesse projeto, tanto com a doação dos peptídeos, quanto com todo seu conhecimento sobre o assunto.

Agradeço a toda a minha família, meu irmão João Victor, minha cunhada Rodriane, minha avó Lúcia, todas as minhas tias, tios, primas e primos, pessoas tão especiais na minha vida que me ajudam a crescer e amadurecer a cada dia.

Gratidão ao meu namorado e companheiro Valter, que esteve comigo todo o tempo durante essa jornada e me ajudou a ultrapassar os momentos difíceis e da mesma forma comemorou comigo a cada mínima conquista.

Gratidão a Paula Andrade, querida Paulinha, que me ensinou as noções básicas de uso do laboratório de microbiologia e me possibilitou iniciar os experimentos.

Gratidão a Barbara Reina, que sempre foi solícita comigo em qualquer momento de dúvida e necessidade.

Gratidão ao Samuel Malheiros, sempre disposto a me ajudar no laboratório e nas dúvidas sobre a microbiologia.

Gratidão a Isadora Agostino, querida aluna de Iniciação Científica que se tornou uma grande amiga companheira, que deixou os dias de experimentos muito mais leves e felizes.

Gratidão aos meus amigos do mestrado, Hamille Viotto, Beatriz Ribas, Beatriz Voss, Marlon Ferreira e Jonatas Oliveira, pelo companheirismo nas clínicas, no laboratório e até mesmo fora da faculdade, vocês foram essenciais nessa jornada.

Aos meus amigos de graduação, que mesmo estando longe sempre me mandavam mensagens de carinho e força para que eu nunca desistisse.

Gratidão as minhas amigas, Dayane, Lariane e Miriam, que alegraram meus dias durante essa caminhada.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino [...] Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade”

Paulo Freire*

* Freire P. Pedagogia da autonomia. São Paulo: Editora Paz e Terra; 1997.

Fusco NS. Potencial da associação de peptídeos antimicrobianos com inativação fotodinâmica contra *Candida albicans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

A capacidade que um microrganismo possui de resistir a efeitos de fármacos que anteriormente eram capazes de eliminá-lo é chamada de resistência microbiana. Devido ao fato deste fenômeno crescer a cada dia, tratamentos alternativos são extremamente necessários. A inativação fotodinâmica (do inglês, photodynamic inactivation - PDI) e sua associação com peptídeos antimicrobianos (PAMs) são opções promissoras para inativação de microrganismos patogênicos, entretanto são escassos os estudos associando este tema contra biofilmes microbianos, além disso, não há relatos na literatura associando o peptídeo melitina com o fotossensibilizador curcumina. Portanto, este estudo teve como objetivo analisar a eficácia dessas associações para efeito antimicrobiano por meio da realização de dois estudos. O primeiro trabalho tratou-se de uma revisão bibliográfica para mapeamento da literatura existente acerca da associação de PDI e PAMs, utilizando de uma busca sistemática para a seleção dos artigos. Trinta e nove artigos foram identificados por meio das buscas em bases de dados. Com exceção de cinco associações, a grande maioria apresentou eficácia antimicrobiana contra diversos microrganismos, susceptíveis e resistentes. O segundo estudo conduzido tratou-se de uma pesquisa laboratorial com o objetivo de avaliar a eficácia do PAM melitina em associação com a PDI mediada pela curcumina contra cepas de *Candida albicans* suscetível e resistente ao fluconazol. Foram utilizadas duas cepas de referência (suscetível e resistente ao fluconazol) e dois isolados clínicos com resistência ao fluconazol. A concentração fungicida mínima (CFM) e a concentração inibitória mínima (CIM) da melitina sozinha foram avaliadas para as quatro cepas. A partir de então foi realizada a caracterização fotofísica da curcumina na presença e ausência da melitina. Análises do efeito antimicrobiano em amostras planctônicas e de biofilme apenas das cepas de referência foram realizadas. Por fim, as amostras de biofilme foram analisadas em microscopia confocal para avaliar a quantidade de curcumina internalizada nos biofilmes em diferentes tempos de exposição com a melitina+curcumina. Os dados foram analisados com estatística descritiva e inferencial, de acordo com o delineamento experimental de cada etapa ($\alpha=0,05$). A CIM da melitina foi diferente para cada cepa (ATCC 90028 - 16 μ g/mL; ATCC 96901 - 62 μ g/mL; e ambos os isolados clínicos 31 μ g/mL). Em relação às avaliações da atividade antifúngica do PAM em associação com a PDI, para ATCC 90028 no formato planctônico, tanto a curcumina quanto a melitina promoveram redução dos valores de log ($p<0,0001$). Quando as amostras permaneceram no escuro, apenas a melitina produziu efeito na viabilidade ($p\leq 0,023$). Quando em biofilme, houve redução na viabilidade promovida pela melitina com exposição a luz ($p<0,0001$). Para a cepa ATCC 96901, em formato planctônico, houve redução nos valores de log quando expostas a luz para os fatores curcumina e melitina sozinhos. Quanto ao biofilme, em nenhuma condição efeito significativo nas contagens de colônias viáveis. Assim conclui-se que a associação da PDI com peptídeos é capaz de promover redução da viabilidade de microrganismos patogênicos e, especificamente, a associação melitina+curcumina deve ser mais investigada a fim de se potencializar o efeito da associação contra cepas de *Candida*.

Palavras – chave: *Candida albicans*. Resistência microbiana a medicamentos. Peptídeos catiônicos antimicrobianos. Fotoquimioterapia.

Fusco NS. Potential of the association of antimicrobial peptides with photodynamic inactivation against *Candida albicans* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The ability of a microorganism to resist the effects of drugs that were previously able to eliminate it is called microbial resistance. Due to the fact that this phenomenon grows every day, alternative treatments are extremely necessary. Photodynamic inactivation (PDI) and its association with antimicrobial peptides (AMPs) are promising options for inactivating pathogenic microorganisms, however, there are few studies associating this topic against microbial biofilms, in addition, there are no reports in the literature. associating the peptide melittin with the photosensitizer curcumin. Therefore, this study aimed to analyze the effectiveness of these associations for antimicrobial effect by carrying out two studies. The first work was a literature review to map the existing literature about the association of PDI and AMPs, using a systematic search for the selection of articles. Thirty-nine articles were identified through database searches. With the exception of five associations, the vast majority showed antimicrobial efficacy against several susceptible and resistant microorganisms. The second study conducted was a laboratory research aimed at evaluating the efficacy of PAM melittin in association with curcumin-mediated PDI against fluconazole susceptible and resistant strains of *Candida albicans*. Two reference strains (susceptible and resistant to fluconazole) and two clinical isolates with resistance to fluconazole were used. The minimum fungicidal concentration (MFC) and the minimum inhibitory concentration (MIC) of melittin alone were evaluated for the four strains. From then on, the photophysical characterization of curcumin in the presence and absence of melittin was performed. Analyses of the antimicrobial effect in planktonic and biofilm samples of only the reference strains were performed. Finally, biofilm samples were analyzed under confocal microscopy to assess the amount of curcumin internalized in biofilms at different exposure times with melittin+curcumin. Data were analyzed with descriptive and inferential statistics, according to the experimental design of each stage ($\alpha=0.05$). The MIC of melittin was different for each strain (ATCC 90028 - 16 $\mu\text{g/mL}$; ATCC 96901 - 62 $\mu\text{g/mL}$; and both clinical isolates 31 $\mu\text{g/mL}$). Regarding the evaluations of the antifungal activity of AMP in association with PDI, for ATCC 90028 in planktonic format, both curcumin and melittin promoted a reduction in log values ($p<0.0001$). When the samples remained in the dark, only melittin had an effect on viability ($p\leq 0.023$). When in biofilm, there was a reduction in viability promoted by melittin with exposure to light ($p<0.0001$). For the ATCC 96901 strain, in planktonic format, there was a reduction in log values when exposed to light for the factors curcumin and melittin alone. As for the biofilm, there was no significant effect on viable colony counts under any condition. Thus, it is concluded that the association of PDI with peptides is capable of promoting a reduction in the viability of pathogenic microorganisms and, specifically, the association melittin+curcumin should be further investigated in order to potentiate the effect of the association against strains of *Candida*.

Keywords: *Candida albicans*. Drug resistance, microbial. Antimicrobial cationic peptides. Photochemotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Candidíase e Resistência Microbiana.....	19
3.2 Inativação Fotodinâmica e Curcumina.....	22
3.3 Peptídeos Antimicrobianos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODO.....	30
4.1 Estudo 1: Potencial da Associação de PAMs com PDI para Eliminação de Microrganismos de Interesse Médico.....	30
4.1.1 Busca dos artigos.....	30
4.1.2 Critérios de elegibilidade.....	30
4.1.3 Coleta de dados e síntese.....	31
4.2 Estudo 2: Potencial Antifúngico da Melitina e de sua Associação com Tratamento Fotodinâmico Mediado pela Curcumina Sobre <i>C. albicans</i> Susceptível e Resistente ao Fluconazol.....	32
4.2.1 Delineamento experimental.....	32
4.2.2 Fotossensibilizador, peptídeos, aparelho de iluminação e microrganismos	32
4.2.3 Caracterização fotofísica.....	34
4.2.4 Estudo piloto com LL – 37.....	34
4.2.5 Análise do efeito antimicrobiano da melitina sobre culturas planctônicas.....	35
4.2.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	36
4.2.5.2 Avaliação do efeito fotodinâmico.....	37
4.2.5.3 Análise de interação entre a melitina e a curcumina.....	38
4.2.6 Análise do efeito antimicrobiano sobre biofilmes.....	38
4.2.7 Planejamento estatístico.....	40

5 RESULTADOS.....	42
5.1 Estudo 1.....	42
5.2 Estudo 2.....	51
5.2.1 Caracterização fotofísica.....	51
5.2.2 Determinação da CIM/CFM dos peptídeos para cada cepa avaliada..	53
5.2.2.1 Resultados utilizando o peptídeo LL-37.....	53
5.2.2.2 Resultados utilizando o peptídeo melitina.....	56
5.2.3 Avaliação do efeito fotodinâmico sobre culturas planctônicas...	60
5.2.4 Análise do efeito antimicrobiano sobre biofilmes.....	65
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE.....	88
ANEXO	109

1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* são patógenos oportunistas do ser humano e possuem habilidade de causar doenças em sítios anatomicamente distintos do hospedeiro¹. Das infecções causadas por *Candida* spp podem ser citadas a infecção superficial e sistêmica². Entre as espécies mais comumente associadas ao desenvolvimento de patologias destacam-se *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida auris*^{2,3} sendo este último, um fungo emergente multirresistente, responsável por surtos de infecções em todo o mundo⁴. Importante ressaltar que, em indivíduos saudáveis, *C. albicans* caracteriza-se como comensal, com um tipo de interação que envolve organismo, a microbiota residente e a imunidade do hospedeiro⁵. Tal fungo pode se transformar em patógeno a partir do resultado de um desequilíbrio local ou sistêmico, como alterações no microambiente local ou a ruptura do estado imunológico do hospedeiro^{6,7}.

A infecção fúngica local mais frequente nos seres humanos é a candidíase, uma condição bastante frequente entre indivíduos imunocomprometidos, com doenças sistêmicas e entre os idosos, principalmente naqueles que fazem uso de próteses parciais e totais⁸. De fato, o uso de próteses, associado ao baixo fluxo salivar, aumentam as chances de desenvolvimento de uma patologia denominada estomatite protética, uma das manifestações clínicas da candidíase⁹. A estomatite define-se por um processo inflamatório crônico da mucosa adjacente às próteses dentais totais e parciais e sua gravidade está diretamente relacionada à presença de *C. albicans* em cerca de 72% dos indivíduos¹⁰.

Devido à proximidade da cavidade oral com o sistema respiratório, o risco de aspiração de patógenos presentes nas infecções locais aumenta, e a principal consequência dessa ocorrência é o desenvolvimento de pneumonia aspirativa, uma doença potencialmente fatal que pode levar o indivíduo a óbito^{11,12}. Nesse mesmo contexto, as espécies de *Candida* também possuem capacidade de desenvolver infecções na corrente sanguínea, pois *C. albicans* trata-se da formadora de biofilme mais prevalente e patogênica das espécies de *Candida*, e

tal fato quando associado a exposição prévia dos pacientes aos antifúngicos azólicos, resulta em fatores de risco para morbidade e mortalidade em casos de candidemia¹³.

O tratamento das infecções por *Candida* spp. é realizado tradicionalmente por meio de medicamentos antifúngicos. Os antifúngicos tópicos convencionais, como a nistatina, não necessariamente são capazes de eliminar as células de *Candida* spp por completo. Tal fato pode ser atribuído ao efeito diluente da saliva concomitante aos movimentos da língua, os quais acabam por reduzir as concentrações da medicação¹⁴. Os fármacos azóis sistêmicos, como o fluconazol foram um grande avanço em termos de eficácia no tratamento da candidíase¹⁵. Entretanto, atualmente, seu uso pode se apresentar limitado devido à evolução do espectro de patógenos fúngicos, e a eclosão de resistência aos azóis¹⁶. As células adquirem resistência ao fluconazol por meio de diferentes vias como a diminuição dos efeitos tóxicos do fármaco através da alteração da enzima alvo que reduz a ligação do fármaco ou a diminuição do acúmulo intracelular da droga através do transporte ativo do medicamento para fora da célula. Além disso a característica fungistática do fluconazol pode fornecer maior oportunidade para o desenvolvimento de resistência¹⁷. Outro antifúngico utilizado para infecções sistêmicas são as equinocandinas. Utilizados somente de forma intravenosa, possuem espectro de ação relativamente amplo, mas sua absorção oral mostra-se pobre e sem previsibilidade¹⁸ e seu uso generalizado também acarreta em resistência entre isolados clínicos de *Candida* spp¹⁹.

A resistência antifúngica está em ascensão e se trata de uma ameaça emergente ao gerenciamento do paciente e do sucesso clínico²⁰. Uma previsão da Organização Mundial da Saúde (OMS) é que, até o ano de 2050, as infecções resistentes a medicamentos matarão 10 milhões de pessoas anualmente²¹. Portanto, é imprescindível a busca por terapias alternativas que possam sanar as consequências oriundas da resistência microbiana e das limitações dos medicamentos antifúngicos convencionais²².

Uma dessas terapias alternativas surgiu no início do século XX e é denominada de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês Antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT, ou Photodynamic Inactivation - PDI)²³⁻²⁵. PDI requer a combinação de três fatores para que seu processo ocorra, são eles: um

agente chamado de fotossensibilizador (FS), luz correspondente ao comprimento de onda de absorção específica do FS (apropriada para a excitação do FS) e presença de oxigênio²³⁻²⁶. Pelo fato de se mostrar eficaz contra uma série de microrganismos, incluindo potencial contra cepas resistentes a fármacos convencionais, a PDI se mostra como uma estratégia promissora tratamento²⁷.

Um FS extensamente descrito na literatura é a curcumina, um pigmento amarelo extraído da *Curcuma longa* e que possui alta absorção de luz e potencial fototóxico contra células fúngicas^{28,29}.

Outra possibilidade antimicrobiana que tem sido investigada é a utilização de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Os PAMs são grupos de moléculas heterogêneas, produzidas por vários tecidos e células em uma extensa variedade de espécies. Eles compõem a resposta imune inata de organismos multicelulares, contém atividades microbidas e imunomoduladoras, e contribuem significativamente no mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções³⁰⁻³².

A melitina é considerada um PAM e é o principal componente tóxico do veneno da abelha *Apis mellifera*. Composto por 26 aminoácidos (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂), a melitina já mostrou efeito antiviral, antibacteriano, antiparasitário, antifúngico e antitumoral^{33,34}. Para que seu efeito antimicrobiano ocorra, seu principal mecanismo de ação trata-se da ligação à superfície da membrana, que gera uma perturbação a integridade das bicamadas fosfolipídicas pela formação de poros, conseqüentemente leva ao vazamento de íons, aumento da permeabilidade, e por fim gera a lise celular^{34,35}.

Outro PAM de destaque é o LL-37, o qual deriva dos dois primeiros resíduos de leucina (L) e 37 aminoácidos, adotando uma estrutura helicoidal³⁶. Da classe das catelicidinas, é secretado pelos seres humanos predominantemente encontrado em neutrófilos, revestimentos epiteliais e monócitos³⁷. O LL-37 além de possuir propriedades antibacterianas, antifúngica, antivirais e capacidade de inibição de formação de biofilme³⁶ é também classificado como “alarmante”, pois possui capacidade de alertar o sistema imunológico adaptativo, através da promoção de inflamação local e capacidade de resposta a sinais de perigo^{37,38}.

Em relação ao tratamento antifúngico convencional, os PAMs possuem várias vantagens, sendo eles multimodais, pois podem atingir diferentes alvos microbianos simultaneamente; multifuncionais, porque além de inativar diretamente o microrganismo, também estimula a defesa contra eles; de ação rápida, e contém atividades anti-inflamatórias e / ou curativas³². Investigações recentes demonstram o potencial antifúngico de uma gama de peptídeos contra cepas de *Candida* spp resistentes ao fluconazol e multirresistentes³⁹⁻⁴¹.

A abordagem combinada de PDI e PAMs tem mostrado potencial a fim de se obter melhores resultados antimicrobianos⁴²⁻⁸⁰. Um número considerável de trabalhos também vem investigando a possibilidade de inativação microbiana de cepas resistentes a medicamentos convencionais com a associação das terapias^{42,46,47,49,50,51,53,56-59,66-68,72,77-79}. A grande maioria dos estudos utilizou cepas bacterianas e o efeito em cepas de *Candida* ainda é pouco estudado. Portanto, faz-se importante avaliar o efeito da combinação dos dois protocolos alternativos com o intuito de se chegar a um tratamento eficaz para a estomatite protética causada por espécies de *Candida*.

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial da utilização de PAMs como possível agente antifúngico e em associação com tratamento fotodinâmico. Para isso, dois estudos foram desenvolvidos.

2.1 Objetivos Específicos

O primeiro estudo teve como objetivo realizar um mapeamento da literatura existente acerca da utilização de PAMs em associação com PDI. Para isso, foi realizada uma revisão de literatura com uma estratégia sistemática para busca e identificação dos trabalhos.

O segundo estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do PAM melitina como possível agente antifúngico e antibiofilme contra *C. albicans* e seu efeito quando associado ao tratamento fotodinâmico com curcumina. Além disso, também foi comparada a resposta obtida com cepa susceptível e resistente ao fluconazol.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir, a revisão de literatura está subdividida pelos tópicos: Candidíase e Resistência Microbiana, Inativação Fotodinâmica e Curcumina e Peptídeos Antimicrobianos.

3.1 Candidíase e Resistência Microbiana

A candidíase oral é a infecção fúngica mais comum nos seres humanos. Trata-se de uma infecção oportunista que acomete a cavidade bucal, causada principalmente pelo supercrescimento das espécies de *Candida*, onde cerca de 80% dos isolados desta infecção clínica são representados pelas espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*⁸. Tal microrganismo se encontra em uma relação comensal na cavidade oral em cerca de 60% de indivíduos adultos saudáveis⁸¹. Entretanto, a infecção torna-se evidente nos casos onde o indivíduo possui algum tipo de imunossupressão e/ou faz uso de prótese totais ou parciais⁸¹.

Clinicamente a candidíase pode se manifestar de duas maneiras, a candidíase branca ou a eritematosa. A candidíase oral branca, como o próprio nome diz, é caracterizada por lesões que possuem a coloração branca, como é o caso da candidíase pseudomembranosa e a hiperplásica. Já a eritematosa contém em sua classificação as lesões de coloração vermelha, incluindo a candidíase atrófica aguda, candidíase atrófica crônica, queilite angular, atrofia papilar central da língua e eritema gengival linear^{81,82}. Em indivíduos acometidos por infecções fúngicas e que possuem algum tipo de imunossupressão, *Candida* spp. inicia um processo de aumento de sua colonização e se espalha pelo trato gastrointestinal e/ou pela corrente sanguínea, acarretando a chamada candidíase invasiva ou candidemia⁸. A candidíase invasiva é reconhecida como uma das principais causas de morbimortalidade no setor da saúde, causada majoritariamente por *C. albicans*⁸³. Devido sua alta taxa de mortalidade (cerca de 71% a 79%) o tratamento necessita ser precoce e preciso, afim de se iniciar a terapia antifúngica correta o mais previamente possível^{8,83}.

Dessa forma, para que haja eficácia no tratamento sobre a candidíase, deve ser levada em consideração a remoção do foco da infecção, como por exemplo, a higienização de dentaduras e próteses fixas. Entretanto, nem sempre apenas com uma boa higienização é possível eliminar a doença e assim, é necessário o tratamento utilizando antifúngicos tópicos ou sistêmicos^{81,84,85}.

Comparada a ampla gama de antibióticos existentes contra bactérias, os fármacos antifúngicos são poucos, e provavelmente refletem a dificuldade em se obter

medicamentos contra um tipo de célula eucariota que não cause toxicidade ao seu hospedeiro⁸⁶. Ainda assim, os antifúngicos disponíveis no mercado atualmente são os tópicos, como a nistatina, que age rompendo a membrana dos fungos; e os sistêmicos, como o fluconazol e o itraconazol que agem na inibição da síntese de ergosterol (componente da membrana celular do fungo), as equinocandinas capazes de agir na síntese de β - (1,3) d- glucano (um polissacarídeo crítico da parede celular), e por fim a flucitosina, que interfere na síntese de RNA e DNA, entretanto ainda não está disponível no Brasil⁸⁷.

Embora existam estes medicamentos antifúngicos presentes no mercado, o prognóstico de pacientes acometidos por infecções por *Candida* ainda pode ser ruim⁸⁸. Tal fato pode ser explicado por um fenômeno chamado de resistência microbiana. A resistência microbiana trata-se da capacidade que um microrganismo possui ou adquire, de resistir a efeitos de medicamentos que anteriormente eram capazes de eliminá-lo⁸⁹. Além disso, este fenômeno é provavelmente justificado pela exposição prolongada dos indivíduos a tais medicamentos, principalmente aqueles imunocomprometidos com candidíase recorrente⁸⁸.

A maior família de medicamentos usados contra fungos é a família dos “azóis”⁸⁸. Seu mecanismo de ação se baseia na interferência da biossíntese do ergosterol, através da inibição da conversão do citocromo P450 de lanosterol em ergosterol. O resultado desta interferência é a diminuição do crescimento e proliferação celular⁹⁰. Durante muito tempo, esta família foi responsável por tratar a maioria das infecções acometidas por espécies de *Candida*. Entretanto, a resistência aos azóis tem aumentado cada dia mais, tanto nos hospitais, quanto *in vitro*⁸⁸. São três as maneiras que as espécies de *Candida* utilizam para contornar a ação dos antifúngicos azóis, são elas: a introdução de bombas de efluxo (afim de bombear a droga para fora da célula); alteração do sítio de ligação da enzima que impede a ligação dos azóis, e por fim, a capacidade da célula de desenvolver vias de contorno como resultado de mutações^{91,92}. Nesse contexto, as equinocandinas pareciam ser a chave para contornar a resistência, visto que todos os fungos possuem β - (1,3) d- glucano. Entretanto, isolados clínicos de *Candida* apresentaram mutações nos genes *FKS1* e *FKS2* que levaram a substituição de aminoácidos, inibindo então as equinocandinas⁸⁸.

Um estudo conduzido por Cowen et al.⁹³ em 2000, demonstrou a capacidade de adaptação de *C. albicans* ao agente antifúngico fluconazol. Os autores utilizaram apenas uma única célula progenitora para dar origem a 12 populações distintas que foram propagadas em série por 330 gerações. Seis populações foram cultivadas com exposição ao fluconazol repetidamente, e as outras seis, não. Dessa forma, conseguiram avaliar a adaptação às concentrações inibitórias do fluconazol em

populações geradas a partir de uma única célula, ou seja, apenas o fator das mutações foi avaliado, já que nenhum genótipo externo penetrou nessas populações. A fim de comparação, foi verificado que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fluconazol em *C. albicans* suscetível ao azol foi de 0,25 µg/ml. Nas populações propagadas sem fármaco não houve mudança na CIM. Por outro lado, duas das populações geradas na presença de fluconazol alcançaram o nível mais alto de resistência (CIM 64,00 µg/ml). Uma terceira população atingiu o nível intermediário de resistência (CIM 4,00 µg/ml). Outras duas tiveram uma resistência aumentada (CIM 16,0 e 64,0 µg/ml) e depois mostraram uma queda. E por fim, a última população apresentou um pequeno aumento na resistência (CIM 0,5 µg/ml), aumentou drasticamente em outra geração (CIM 8,0 µg/ml) e, em seguida, diminuiu. Além disso, os valores de CIM aumentados do fluconazol foram acompanhados por um aumento correspondente na resistência ao itraconazol e cetoconazol. Tais resultados demonstram que a exposição frequente de *C. albicans* ao fluconazol pode conferir uma vantagem de adaptação causada por mutações⁹³.

O biofilme formado por espécies de *Candida* também representa uma causa frequente de infecções⁹⁴. O biofilme é uma comunidade estruturada circundada por uma matriz polimérica autoproduzida e aderente a uma superfície⁹⁵, que por conta desta “barreira” que é formada, há uma redução drástica na susceptibilidade microbiana aos agentes terapêuticos⁹⁴.

O biofilme de *C. albicans* progride em três fases distintas: a fase precoce (0 a 11h) na qual as células iniciam o crescimento e agregação; a fase intermediária (12 a 30h) que é caracterizada pelo aparecimento de material predominantemente não celular, parecido como uma névoa; a fase de maturação (38 a 72h) na qual a quantidade de material extracelular aumenta de acordo com o tempo de incubação, até a completa cobertura das colônias, e por fim, a fase de dispersão, onde as células não aderentes são liberadas do biofilme para a colonização do meio circundante⁹⁶.

Em 2018, Singh et al.⁹⁷ foram capazes de demonstrar a capacidade de antifúngicos, dentre eles o fluconazol e anfotericina B, em penetrar biofilmes de cepas padrão e isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Foi visto que dependendo da natureza do antifúngico e da espécie de *Candida*, a capacidade de penetração variou. A penetração do posaconazol e da anfotericina B foi significativamente pobre (redução de 55%; $P < 0,001$ e 35%; $P < 0,001$, respectivamente) para todas as cepas avaliadas. Sobre o biofilme de *C. krusei*, o fluconazol foi capaz de adentrar, entretanto sem sucesso, já que esta cepa é intrinsicamente resistente a ele; já o voriconazol e a caspofungina que são eficazes, não conseguiram penetrar nos biofilmes ($P < 0,01$). Para as cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* houve

uma redução média de 18%, 10% e 23% para a penetração do voriconazol, fluconazol e caspofungina respectivamente. Mesmo aqueles antifúngicos que conseguiram penetrar bem nos biofilmes, não foram capazes de matar as células, da mesma forma que as drogas cuja penetração foi prejudicada. Dessa forma, fica claro que além do fato do biofilme formar uma proteção para que os agentes antifúngicos não possam penetrar dentro dele, fatores intrínsecos também são responsáveis pela inativação do fármaco⁹⁷. Diante do exposto, a busca por tratamentos que não gerem resistência e que são eficazes contra *C. albicans* em formato planctônico e em biofilme são descritos na literatura. Alguns deles serão discutidos nos itens a seguir.

3.2 Inativação Fotodinâmica e Curcumina

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês Antimicrobial Photodynamic Therapy – aPDT, ou Photodynamic Inactivation – PDI) foi descoberta acidentalmente em 1900 por um estudante de medicina, Oscar Raab, enquanto estava em experimentos utilizando corante vermelho de acridina em *Paramecium* spp. em sua tese de doutorado. Raab percebeu que a toxicidade observada contra este microrganismo dependia da hora e da quantidade de luz solar que entrava na sua bancada através da janela⁹⁸. A partir disso, anos depois outros autores iniciaram o estudo dessa mesma abordagem contra carcinomas de pele⁹⁹. Durante muito tempo a Terapia Fotodinâmica foi apenas estudada no âmbito de tratamento anticâncer, devido a descoberta da penicilina por Alexander Fleming²³ em 1928. Todavia, os olhares dos pesquisadores voltaram para a PDI durante o início de 1990, quando começaram a surgir as primeiras infecções resistentes a medicamentos no setor de saúde²³. Para que seu processo ocorra, a PDI requer a combinação de três fatores, um agente fotossensibilizante chamado de fotossensibilizador (FS), luz correspondente ao comprimento de onda de absorção específica do fotossensibilizador, apropriada para a excitação do FS e presença de oxigênio²³⁻²⁶. Primeiramente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS, processo chamado de fotossensibilização. Após a absorção de um fóton de luz com comprimento de onda adequado¹⁰⁰, o fotossensibilizador sai de seu estado fundamental para um estado eletronicamente excitado. A partir disso ele pode voltar ao seu estado normal por meio de fosforescência (através da emissão de luz) ou por dois mecanismos geradores de espécies reativas de oxigênio²³ (EROs): reagir diretamente com substrato formando íons radicais que interagem com oxigênio e gera produtos oxigenados (Tipo I), ou, transferir sua energia para o oxigênio diretamente e formar o oxigênio singleto, uma espécie oxidativa altamente reativa, que pode oxidar muitas moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos (Tipo II)¹⁰¹. Essas duas reações podem ocorrer

simultaneamente e são grande parte influenciadas pelo fotossensibilizador, substrato e concentração de oxigênio^{23,25}. Após a geração de EROs, o FS pode voltar para seu estado fundamental, ou seja, pronto para absorver um novo fóton²³. Os radicais gerados atuam na membrana celular fúngica, permitem a internalização adicional de FS, e posteriormente, as EROs causam desequilíbrio na homeostase celular, que resulta em morte por apoptose, necrose ou autofagia²⁴. Atualmente, uma nova reação foi proposta. Independente de oxigênio, essa reação pode ser denominada de “via fotoquímica do Tipo III” e envolve a transferência de elétrons fotoinduzida que produz radicais inorgânicos reativos¹⁰².

A PDI possui grande potencial para se tornar um novo protocolo padrão para o tratamento de candidíase, visto que a terapia não é invasiva em pacientes imunodeficientes e idosos, é de fácil realização na cavidade oral, indolor, e até o momento apresenta eficácia e nenhuma reação adversa relatada¹⁰³. Além do mais, os medicamentos comuns normalmente trabalham agindo em sítios nas células os quais contém alta especificidade. Já a PDI, por conta de funcionar a partir da geração de EROs que atua danificando diversas moléculas microbianas, as chances dos microrganismos adquirirem resistência a ela é considerada altamente improvável¹⁰⁴.

Vários são os estudos presentes na literatura que investigaram a inativação fotodinâmica de *Candida* spp. Dentre eles, em 2013, Dovigo et al.¹⁰⁵ demonstraram a capacidade de fotoinativação de isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* de pacientes com estomatite protética em cultura planctônica e em biofilmes. Tanto nas células planctônicas quanto nos biofilmes dos isolados clínicos de *C. albicans*, e de *C. tropicalis*, a exposição das culturas ao tratamento utilizando diferentes concentrações do fotossensibilizador e doses luz promoveu uma redução significativa na viabilidade celular em todas as associações em comparação ao grupo controle (sem luz e sem fotossensibilizador). Já nas células planctônicas de *C. glabrata*, todas as associações de luz e FS promoveram reduções significativas na viabilidade fúngica ($p < 0,001$), entretanto em alguns isolados não foi observada inativação total¹⁰⁵.

A inativação in vivo de *C. albicans* pela PDI também já é estudada. Este tipo de investigação é relevante por conta da maior semelhança com a realidade clínica de pacientes com candidíase. Em 2013, Carmello et al.¹⁰⁶ avaliaram a eficácia da PDI em uma cepa de referência de *C. albicans* em modelo de candidíase em roedores. Mais uma vez, a associação do fotossensibilizador com luz foi capaz de reduzir significativamente ($p = 0,027$) a viabilidade de *C. albicans* nas maiores concentrações do FS em comparação ao grupo controle (sem luz e sem FS)¹⁰⁶.

Na literatura, é ampla a variedade de fotossensibilizadores utilizados na PDI. Na busca do fotossensibilizador ideal, a curcumina é intensamente explorada. A curcumina

é um composto fenólico, oriunda das raízes da *Curcuma longa*, uma planta herbácea popular pelas suas propriedades calmantes e antimicrobianas¹⁰⁷. A curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona], possui peso molecular de 368,38 g/mol e é uma molécula lipofílica, capaz de adentrar a membrana celular rapidamente. Esta substância se manifesta como um composto cristalino, com uma cor amarela alaranjada brilhante, dessa forma é muito utilizada como agente corante, bem como aditivo alimentar até mesmo declarado pela OMS¹⁰⁸. Dados mostram que a curcumina não exprime toxicidade nem para animais, nem para humanos, o que a torna um fotossensibilizador mais bem tolerado além de considerada “não tóxica” pela FDA^{108,109}.

Quando o termo “Curcumin” é buscado na base de dados MEDLINE, mais de 18 mil estudos surgem. Em 2019 uma revisão foi capaz de fornecer uma visão bibliométrica abrangente de toda a literatura sobre a curcumina e suas atividades¹¹¹. Seu primeiro relato foi em 1970, onde foi investigado seu efeito hipocolesterolêmico em ratos¹¹². Atualmente, a maioria das publicações se concentra em estudos da bioquímica, química, oncologia e farmacologia da curcumina. Além disso, as suas ações mais estudadas são os efeitos anti- tumoriais, anti-inflamatório e contra o estresse oxidativo¹¹¹.

Em 2011, Dovigo et al.²⁹ tiveram como objetivo avaliar se os efeitos antifúngicos da curcumina poderiam ser melhorados com excitação de luz. Para tanto, foi utilizada uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) afim de verificar o efeito antifúngico, e a curcumina utilizada foi a natural. De acordo com o artigo, houve uma redução significativa na viabilidade de *C. albicans* após o tratamento fotodinâmico utilizando a curcumina — quando comparado ao grupo controle (sem luz e sem FS) — além dessa redução ser dependente da concentração do FS. Da mesma forma, a fotoinativação de biofilmes de *C. albicans* também foi eficaz. Conforme aumentou a concentração de curcumina, a atividade metabólica do biofilme reduziu. Logo, este trabalho pôde demonstrar que a curcumina quando irradiada com luz azul, se mostra um eficaz fotossensibilizador para inativação de *C. albicans* planctônica e em biofilme²⁹.

No contexto da Odontologia, a curcumina por si só ou associada a luz como agente fotossensibilizador na PDI possui várias possibilidades de aplicações. Por conta das suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes, é estudada majoritariamente na periodontia, para tratamento de gengivite e periodontite¹¹³. Desempenha ação também na odontologia hospitalar e estomatologia, a respeito de suas propriedades anticâncer, e por atuar no carcinoma de cabeça e pescoço, mucosite oral, estomatite aftosa recorrente, dentre outras¹¹⁴⁻¹¹⁶. Outra atuação muito estudada da curcumina é seu efeito antibacteriano em células de *Streptococcus mutans*, a bactéria mais cariogênica encontrada na cavidade bucal. O efeito fungicida também não pode

deixar de ser citado, já que a curcumina possui várias ações já relatadas contra diversas espécies de *Candida*¹⁰⁷.

Em 2020, foi desenvolvido uma formulação de um enxaguatório bucal à base de microemulsão com curcumina. O FS foi associado ao polissorbato 80 (surfactante não iônico que possui pouca citotoxicidade) e ao óleo de linhaça, para driblar sua baixa solubilidade. Então, foi feita a análise do potencial antimicrobiano deste enxaguatório contra biofilmes de fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas. Dando ênfase a atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, a PDI mostrou um efeito dependente da concentração de curcumina e do tempo de irradiação, sendo que a maior redução foi vista no tratamento com maior tempo de irradiação e maior concentração do FS, o que sugere um potencial uso clínico da curcumina na cavidade oral¹¹⁷.

3.3 Peptídeos Antimicrobianos

Outro tratamento que é exhaustivamente descrito na literatura é o uso dos PAMs. Os peptídeos são polímeros de aminoácidos que possuem peso molecular baixo, e expressam diversas funções, dentre elas, atividades imunomodulatória e antimicrobiana de amplo espectro contra vírus, fungos e bactérias gram-negativas e gram-positivas. O primeiro relato da descoberta de um PAM foi em meados de 1939, quando Dubos foi capaz de extrair um agente antimicrobiano, a gramidicina de uma cepa de *Bacillus brevis*¹¹⁸. Desde então, a lista de peptídeos antimicrobianos já descritos é extensa. O *Antimicrobial Peptide Database* (APD) contém quase 3000 peptídeos, provenientes de seis reinos (animal, plantae, fungi, monera, archea e protista) além dos sintéticos¹¹⁹.

São várias as classificações utilizadas para dividir os peptídeos em categorias de acordo com as suas características. A mais difundida entre os pesquisadores e ao mesmo tempo mais simples, divide-os em três grandes grupos estruturais: peptídeos α -helicoidais, peptídeos em folha β e peptídeos estendidos^{31,120}.

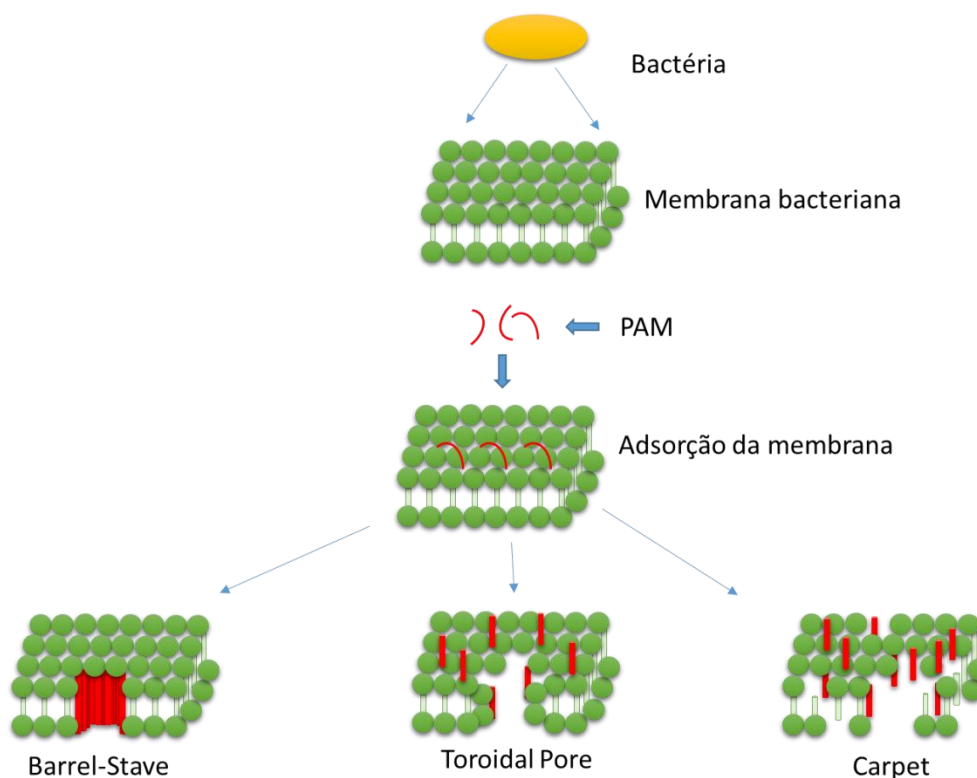
Existem relatos de que os peptídeos antimicrobianos possuem maior afinidade por microrganismos do que células de mamíferos. Em um estudo feito por Welling et al.¹²¹, foi testada a hipótese de que os PAMs conseguem discriminar entre células microbianas e tecidos do hospedeiro. Foi visto que os peptídeos usados no estudo se concentraram com uma taxa significativamente alta e em maior extensão em lesões em roedores causadas por *C. albicans* e bactérias, do que em comparação com tecidos não infectados¹²¹.

Os PAMs utilizam de mecanismos precisos de ação, cujo resultado é a morte celular. A teoria mais difundida sobre mecanismos de ação dos peptídeos trata-se de suas capacidades de atuação nas membranas das células microbianas. Eles podem

causar defeitos na membrana que resulta em poros e leva ao vazamento de metabólitos e íons, seguida pela despolarização da célula, perda da respiração e por fim a morte celular. Outros mecanismos de ação também são citados além dos defeitos na membrana, como a inibição de organelas intracelulares de patógenos fúngicos¹²². Além do mais, os peptídeos antimicrobianos por atuarem nas membranas bacterianas e não em proteínas específicas das células (como a maioria dos antibióticos) é praticamente improvável o desenvolvimento de resistência microbiana a eles¹²³.

Alguns modelos são propostos a fim de elucidar como os PAMs causam a permeabilização da membrana. No modelo *Barrel-Stack*, o peptídeo se fixa na membrana, atinge sua concentração limite e inicia a formação de poros dentro do núcleo hidrofóbico da membrana. No modelo *Carpet*, os peptídeos são atraídos eletrostaticamente a superfície da membrana; quando atingem altas concentrações, efeitos parecidos como de um detergente começam a acontecer, como a formação de micelas e poros que rompem a membrana do microrganismo. Por fim, o modelo *Toroidal Pore*, se define pela agregação do peptídeo dentro da membrana de tal forma que as monocamadas de lipídios se curvam em torno do poro. Este último, descreve o mecanismo de ação da única catelicidina humana, o LL-37¹²⁴⁻¹²⁶.

Figura 1 - Ilustração sobre os mecanismos de ação dos PAMs



Fonte: Elaboração própria baseada em Boparai¹¹⁹ 2020

O LL-37 é uma molécula de alto conteúdo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. É uma molécula carregada positivamente (+6 em pH ~ 7,4) encontrada naturalmente nas glândulas salivares de indivíduos saudáveis¹²⁷. Seu nome origina-se da sua composição, que consiste em 37 aminoácidos, cujo os primeiros são duas leucinas (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES). Sua estrutura é linear catiônica- α -helicoidal para conseguir exercer sua função de defesa primária contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. A atividade de estimulação e regulação do sistema imune inato e adaptativo do LL-37 também é explorada¹²⁸. O LL-37 é gerado a partir de uma pró-proteína chamada de hCAP-18 que se mantém armazenada em grânulos de neutrófilos e células epiteliais, e que após a ativação por meio da clivagem pela proteinase 3, é transformada em LL-37¹²⁹.

Em 2014, Tsai et al.¹³⁰ demonstraram a atividade antifúngica do LL-37 contra células planctônicas uma cepa de referência de *C. albicans*. A atividade microbicida do LL-37 foi dependente da dose, onde a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ inibiu fortemente o crescimento do fungo, e apenas 5 $\mu\text{g/mL}$ já apresentou um leve efeito de inibição sobre o crescimento de *Candida*¹³⁰. A atividade antibiofilme do LL-37 contra *C. albicans* também foi elucidada na literatura. Um estudo conduzido por Luo et al.¹³¹ em 2017,

demonstrou a capacidade antibiofilme do LL-37 sobre *C. albicans* e outras bactérias. Dando ênfase a *C. albicans*, o peptídeo apresentou significativa eficácia na prevenção da formação de biofilme e foi eficaz também contra biofilmes precoces utilizando o ensaio de cristal violeta¹³¹. Entretanto, um estudo apresentado por Rapala-Kozik et al.¹³² elucidou a capacidade de *C. albicans* de se proteger do peptídeo LL-37. *C. albicans* é capaz de produzir e secretar 10 membros de proteases aspárticas (SAP), capazes de degradar uma variedade de proteínas humanas. Em tal estudo, o grupo teve como objetivo avaliar a capacidade dos SAPs produzidos pelo fungo em processar o peptídeo. Como resultado eles obtiveram que três, dos dez SAPs foram capazes de extinguir as propriedades antifúngicas do LL-37¹³².

Outros fortes candidatos a agentes antimicrobianos dentro da indústria farmacêutica originam-se de misturas sofisticadas de secreções venenosas³³. Cerca de 15% dos animais presentes no planeta Terra são capazes de produzir substâncias – dentre elas estão presentes sais, moléculas orgânicas de baixo peso molecular, proteínas e peptídeos – para matar presas ou se defender de predadores¹³³. Os peptídeos decorrentes do veneno possuem seletividade requintada, potência robusta e segurança relativa o que faz com que terapias inspiradas em substâncias oriundas dos venenos pareçam promissoras³³.

O veneno de abelha é reconhecido como uma arma potente no reino animal. Na medicina tradicional oriental o veneno da abelha é usado como um anti-inflamatório não-esteroidal para alívio de dores e no tratamento de doenças inflamatórias crônicas¹³⁴. A melitina é o principal componente tóxico do veneno da abelha europeia *Apis mellifera* e é extensamente estudado como peptídeo antimicrobiano. Trata-se de um peptídeo anfifílico e catiônico, constituído por 26 aminoácidos (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂). Composta por duas hélices α conectadas por um segmento flexível, a melitina produz sua ação antimicrobiana através da interação com as membranas celulares, que induz a formação de poros e por fim, desencadeia a lise celular³³. De forma geral, seu efeito se enquadra no modelo “*toroidal pore*” e suas ações na membrana acontecem principalmente devido a interações hidrofóbicas e eletrostáticas¹³⁵.

São várias as pesquisas que indicam a eficácia da melitina contra *Candida* spp. A maioria delas se concentram em estudos a respeito de culturas planctônicas de cepas de referência e isolados clínicos de *C. albicans*, sem relatos de resistência a antifúngicos convencionais³³. De modo geral, as explicações sobre o mecanismo de ação da melitina sobre *Candida* spp. se concentram na atividade de desregulação da membrana, além de indução da apoptose causada pela externalização de fosfatidilserina, geração de EROs e despolarização da membrana interna mitocondrial^{33,135,136}. Dentre as pesquisas

que utilizaram a melitina com o intuito de avaliar o efeito antifúngico, houve grandes discrepâncias nos valores de CIM e CFM. Tal efeito pode ser explicado pela diferença de metodologias e diferentes graus de pureza do peptídeo^{137,138}.

Atualmente as pesquisas existentes que associaram a melitina com PDI investigaram apenas o efeito antitumoral. Ambos os estudos associaram o efeito da melitina com clorina e6, um fotossensibilizador derivado da protoporfirina com o intuito de potencializar e aprimorar o efeito anti-câncer das duas terapias^{139,140}.

4 MATERIAL E MÉTODO

De acordo com a proposição deste trabalho, dois estudos independentes foram realizados. Por essa razão, a descrição dos métodos utilizados foi subdividida em dois subitens.

4.1 Estudo 1: Potencial da Associação de PAMs com PDI para Eliminação de Microrganismos de Interesse Médico

A seguir, está descrita a metodologia utilizada para a realização do primeiro estudo.

4.1.1 Busca dos artigos

Este primeiro estudo teve como objetivo realizar um mapeamento da literatura existente acerca da utilização de PAMs em associação com PDI para eliminação de microrganismos. Para isso, os bancos de dados eletrônicos Medline (Pubmed), Lilacs (BVS), Scopus e Scielo foram pesquisados utilizando uma estratégia de busca específica para cada base de dados. Foram utilizadas palavras-chave ou termos relacionados à PAMs e PDI ((Photochemotherapy) OR (Photochemotherapies) OR (Photodynamic Therapy) OR (photoinactivation) OR (Photoradiation) OR (Photosensitizing Agents) AND peptides). Para garantir uma estratégia de busca com alta sensibilidade, nenhuma restrição de tipo de estudo ou população foi usada. Não houve limite quanto à data de publicação, mas foram aceitos apenas artigos em Inglês ou Português. O processo de busca dos artigos foi finalizado em 19 de abril de 2022.

4.1.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios para inclusão foram estabelecidos da seguinte forma: (a) pesquisas que investigaram o efeito da associação de PAMs com agentes fotossensibilizadores em PDI com finalidade antimicrobiana; (b) pesquisas que investigaram o uso de PAMs com potencial fotossensibilizador. As buscas resultaram em 97.185 os quais foram inicialmente rastreados para remoção de duplicatas e dos trabalhos em idiomas não aceitos na pesquisa, utilizando-se para isso o gerenciador de referências Mendeley (Mendeley Desktop versão 1.19.4 © 2008-2019 Mendeley Ltd). Em seguida, a pesquisadora examinou todos os títulos e resumos dos 92.824 estudos pré-selecionados com o software Rayyan (<https://rayyan.qcri.org/>) e aplicou os critérios de elegibilidade. O software tornou possível classificar cada referência como incluída, excluída ou incerta. Registros classificados como 'incertos' foram discutidos com o

grupo de pesquisa para a decisão final. Ao final da análise, 39 estudos puderam ser selecionados e incluídos na revisão.

4.1.3 Coleta de dados e síntese

Um formulário foi desenvolvido para orientar a extração de dados dos artigos selecionados bem como para padronizar as informações que seriam extraídas de todos os trabalhos. Este formulário foi desenvolvido com base nos objetivos específicos da revisão de literatura e quais informações seriam relevantes para serem discutidas. Previamente sua aplicação, foi realizado pré-teste em uma amostra aleatória de três estudos. Em seguida, o formulário sofreu ajustes e então foi finalizado em sua versão final para a aplicação definitiva (Apêndice A). Um único pesquisador realizou a coleta dos dados. Em seguida, as informações foram tabuladas e apresentadas de maneira descritiva em tabelas. As informações obtidas por meio dessa revisão foram utilizadas para a escrita da revisão de literatura e discussão da presente dissertação e também deram origem a um artigo que está apresentado no Apêndice B.

4.2 Estudo 2 - Potencial Antifúngico da Melitina e de sua Associação com Tratamento Fotodinâmico Mediado pela Curcumina sobre *C. albicans* Susceptível e Resistente ao Fluconazol

A seguir, está descrita a metodologia utilizada para a realização do segundo estudo.

4.2.1 Delineamento experimental

Neste estudo o delineamento utilizado foi o experimental, realizado em laboratório, com o objetivo de avaliar a eficácia de PAMs como possível agente antifúngico e antibiofilme sobre cepas de *C. albicans* e seu efeito quando associado ao tratamento fotodinâmico com curcumina. Além disso, também foi comparada a resposta obtida com cepas susceptíveis e resistentes ao fluconazol.

4.2.2 Fotossensibilizador, peptídeos, aparelho de iluminação e microrganismos

A curcumina sintética livre foi fornecida pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que também atua como colaborador deste estudo. Todas as análises de caracterização estrutural e físico-química dos produtos de síntese, com controle de qualidade de cada produto gerado foram realizadas pelo Laboratório de Química Bioorgânica da UFSCar. A ressuspensão foi realizada com dimetilsulfóxido (DMSO) a 2,5%²⁹ e solução salina.

A síntese dos peptídeos antimicrobianos foi realizada no Instituto de Química de Araraquara (IQ- UNESP) pelo Prof. Dr. Norival Alves Santos-Filho que atua como colaborador do projeto. O grau de pureza foi confirmado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) analítico em, no mínimo, 95%. Após a purificação, os peptídeos foram liofilizados e mantidos dessa forma até o momento da utilização. A ressuspensão foi realizada com água ultrapura estéril. Os peptídeos utilizados no estudo foram o LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ-RIKDFLRNLPRTES-NH₂) e a melitina (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH₂)^{141,142}. Importante ressaltar que, inicialmente, o projeto de pesquisa previa a utilização somente do LL-37. No entanto, como os testes iniciais não evidenciaram efeitos antifúngicos que suportassem a continuidade dos experimentos, os testes com o LL-37 foram interrompidos e a melitina foi inserida. Por essa razão serão apresentados dados iniciais do LL-37 e em seguida, os dados com a melitina.

Também é importante justificar que a pesquisadora principal previa acompanhar a síntese da curcumina sintética e dos peptídeos antimicrobianos nos laboratórios das

universidades. No entanto, devido às restrições impostas em razão da pandemia, esses estágios não puderam ser realizados.

Para a realização da PDI, foi utilizado como fonte de luz um equipamento com emissores do tipo LED no comprimento de onda de predominantemente em 450nm (+/- 10nm) e com irradiância de 47mW/cm². A fluência avaliada foi de 18,3J/cm².

Foram utilizadas duas cepas de referência de *C. albicans*, sendo uma susceptível e outra resistente ao fluconazol (ATCC 90028 e ATCC 96901, denominadas ao longo do estudo como CaS e CaR, respectivamente) e dois isolados clínicos da mesma espécie, com resistência ao fluconazol (CA14 e CA70, denominados ao longo do estudo como R14 e R70, respectivamente) coletados de pacientes com candidíase pseudomembranosa também HIV positivos (CIM ao fluconazol: R14 – 64 µg/mL, R70 – 32 µg/mL)¹⁴³. Os isolados clínicos com resistência ao fluconazol foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, professora Associada do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) de São José dos Campos – UNESP (ANEXO A e B).

A princípio, foi realizada a etapa de obtenção do estoque microbiano com os microrganismos congelados. Para isso, foram feitas as reativações das quatro cepas armazenadas na sala de Freezers do laboratório de Microbiologia Aplicada da FOAr. As cepas foram plaqueadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,05 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD) a 37°C por 48 horas. Em seguida dez colônias foram transferidas para o meio YNB com 100mM de glicose (YNBg) e incubadas por 20 horas. Assim que a densidade óptica (DO) atingiu a metade da fase de crescimento exponencial (mid-log) de cada microrganismo (CaS 0,55 ± 0,08 nm; CaR 0,39 ± 0,08 nm; R14 0,648 ± 0,02 nm; R70 0,568 ± 0,03 nm), as soluções microbianas foram centrifugadas a 4000rpm/5 minutos. O pellet foi então descartado e foi acrescentado 2,5 ml de YNBg duas vezes concentrado e 2,5ml de glicerol 50%. Um volume de 0,25ml da solução foi distribuído em tubos criogênicos etiquetados e armazenados em freezer -80°.

Os microrganismos foram mantidos à - 80°C e, no momento de utilização, foram descongelados e reativados em meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,05 mg/mL de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD) a 37°C por 48 horas. Em seguida, cinco colônias foram transferidas para o meio YNB com 100mM de glicose (YNBg) e incubadas a 37°C por 16 horas (pré-inóculo- PI). Após incubação, a suspensão fúngica foi diluída na razão de 1:20 no mesmo meio de cultura (0,5mL do PI e 9,5mL de YNBg), o qual permanecia incubada a 37°C até que a densidade óptica (DO) atingisse a metade da fase de crescimento exponencial (mid-log) de cada microrganismo, de acordo com sua curva de crescimento. Em seguida, as

concentrações das suspensões foram padronizadas em aproximadamente 1×10^4 UFC/mL, regulando a DO em espectrofotômetro a 540 nm (Biospectro®).

4.2.3 Caracterização fotofísica

Os espectros de absorção da curcumina associada ou não à melitina foram analisados utilizando espectrofotômetro Bio-Tek Instruments Highland Park, Box 998 (Winooski, Vermont, EUA)¹⁴⁴. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, utilizando a curcumina em diferentes concentrações (10, 20, 40, 60 e 80 μ M correspondente a 3,68 7,36, 14,72, 22,08, 29,44 μ g/mL respectivamente) dissolvidas em 5% de DMSO e 95% de solução salina estéril, com o intuito de se investigar seu comportamento óptico e selecionar uma concentração que possibilitasse a obtenção de leituras dentro do limite de detecção do equipamento. Conhecido o espectro, foi selecionada a concentração de 3,68 μ g/mL (10 μ M) a qual foi então associada à melitina na concentração de 62 μ g/mL (maior concentração inibitória mínima encontrada para as cepas de *C. albicans*). Foi conduzido ensaio de fotodegradação por meio da análise em diferentes tempos de iluminação (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 30 minutos).

4.2.4 Estudo piloto com LL-37

Esta etapa teve como objetivo determinar as concentrações de LL-37 que seriam utilizadas nas etapas subsequentes do estudo. Os primeiros testes foram realizados com esse peptídeo com o intuito de se obter a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do LL-37 para cada cepa investigada.

A metodologia inicialmente empregada seguiu as normas desenvolvidas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute¹⁴⁵ e European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST¹⁴⁶ para o teste de microdiluição. As suspensões fúngicas foram ajustadas na ordem de 10^4 UFC/mL, centrifugadas a 4000xg/5 minutos e ressuspensas em YNBg estéril. Os testes foram iniciados com a cepa padrão CaS 90028.

A solução do peptídeo foi preparada por meio da dissolução do pó liofilizado (1mg) em 1mL YNBg estéril, obtendo-se assim uma solução mãe que originou as concentrações a serem testadas.

Alíquotas de 150 μ L do meio YNBg estéril foi adicionado às cavidades de placas de microdiluição com fundo em forma "U" (Kasvi®). Em seguida, 150 μ L da solução de LL-37 foram adicionados para obtenção da concentração inicial de 320 μ g/mL na primeira linha da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes foram obtidas

após diluição seriada na placa, partindo-se da concentração inicial até 5 µg/mL, pela transferência de 150µL do conteúdo ao poço subsequente. As concentrações de LL-37 testadas foram definidas com base na literatura¹³⁰. Para os poços da última linha, foram dispensados 150 µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. Posteriormente, foram inseridos 15 µL da suspensão fúngica (10^4 UFC/mL) em todos os poços, obtendo-se uma concentração final no poço na ordem de 10^3 UFC/mL. Poços controles possuíram i. meio de cultura estéril e ii. meio de cultura e inóculo fúngico.

As placas foram mantidas em estufa bacteriológica (37°C), por 24h. Para prevenir secagem, cada placa foi selada. A CIM corresponderia à menor concentração na qual, após o período de incubação, houvesse inibição do crescimento de microrganismos (ausência de precipitado microbiano ou turvação no meio de cultura). Após a homogeneização do conteúdo dos poços, a turvação do meio foi lida a olho nu e confirmada em espectrofotômetro a 540 nm (Biospectro®). Foram obtidas diluições seriadas a partir do conteúdo de cada orifício (10^{-1} a 10^{-5}) que foram semeadas, em duplicata, em meio de cultura SDA para obtenção das UFC/mL conforme já descrito anteriormente. A menor concentração de LL-37 que inibisse o crescimento de colônias seria considerada a CFM. A clorexidina foi utilizada como controle positivo.

Como não foram obtidos resultados de morte fúngica, a metodologia foi repetida com alterações em diferentes ocasiões: i. a concentração máxima de LL-37 foi aumentada para 512µg/mL; ii. a dissolução do peptídeo foi realizada em solução salina ao invés de meio de cultura; iii. a incubação foi realizada por apenas 30 minutos ao invés das 24h; iv. foi realizada nova síntese do peptídeo para repetir os testes; v. inclusão de uma cepa de *Streptococcus mutans* (UA 159 ATCC 700610) com finalidade de comparar os resultados obtidos com a cepa fúngica.

De acordo com os resultados que estão descritos na seção 5.2.2.1 nenhuma das tentativas resultou em efeito antifúngico para as cepas de *Candida*. Por essa razão, o peptídeo LL-37 foi substituído pela melitina para a realização do estudo.

4.2.5 Análise do efeito antimicrobiano da melitina sobre culturas planctônicas

A análise em culturas planctônicas ocorreu em três etapas, sendo elas: i. a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da melitina para cada cepa investigada; ii. a análise de possível interação entre o peptídeo e a curcumina por meio do método de tabuleiro (checkerboard); iii. avaliação do efeito fotodinâmico na presença da melitina.

4.2.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A primeira etapa do projeto foi a determinação da CIM do peptídeo melitina para cada cepa avaliada. A metodologia empregada seguiu as normas desenvolvidas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute¹⁴⁵ e European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST¹⁴⁶ para o teste de microdiluição. Para isso, as suspensões fúngicas foram ajustadas na ordem de 10^4 UFC/mL, centrifugadas a 4000xg/5 minutos e ressuspensas em YNBg estéril. Alíquotas de 125 μ L do meio YNBg estéril foi adicionado às cavidades de placas de microdiluição com fundo chato (Kasvi®). Em seguida, 125 μ L da solução de melitina foram adicionados para obtenção da concentração inicial de 500 μ g/mL na primeira linha da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes foram obtidas após diluição seriada na placa, partindo-se da concentração inicial até 7,8 μ g/mL, pela transferência de 125 μ L do conteúdo ao poço subsequente. As concentrações de melitina testadas foram definidas com base na literatura¹³⁷. Para os poços da última linha, foram dispensados 125 μ L do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. Por fim, foram inseridos 12,5 μ L da suspensão fúngica (10^4 UFC/mL) em todos os poços, obtendo-se uma concentração final no poço na ordem de 10^3 UFC/mL. Poços controles conteram apenas o meio de cultura estéril e meio de cultura com inóculo fúngico.

Para cada concentração foi utilizado dois poços por ocasião, com cinco ocasiões distintas. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica (37°C), por 24h. Para prevenir secagem, cada placa foi selada. A CIM correspondeu à menor concentração na qual, após o período de incubação, houve inibição do crescimento fúngico (ausência de precipitado microbiano ou turvação no meio de cultura). Após a homogeneização do conteúdo dos poços, a turvação do meio foi lida a olho nu e confirmada em espectrofotômetro a 540 nm (Biospectro®). Foram obtidas diluições seriadas a partir do conteúdo de cada orifício (10^{-1} a 10^{-4}) que foram semeadas, em duplicata, em meio de cultura SDA. As placas foram incubadas por 48 horas (37°C) para crescimento de colônias. Após a contagem, foram obtidas a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de UFC/mL foi calculado [$\text{UFC/mL} = (\text{número de colônias} \times 10) / q$, onde n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2, 3, 4 ou 5), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas]. A menor concentração de melitina que inibiu o crescimento de colônias foi considerada a CFM.

4.2.5.2 Avaliação do efeito fotodinâmico

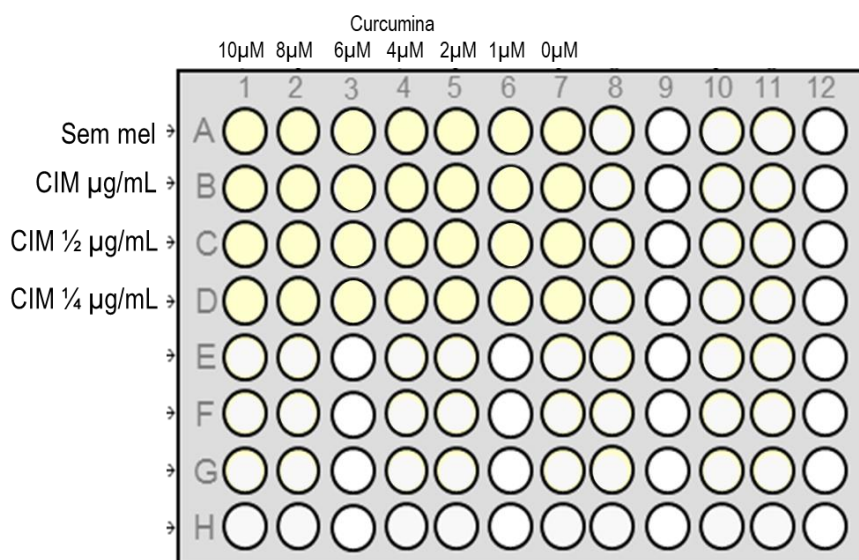
A princípio, foi realizado um estudo piloto microbiológico com a utilização da curcumina sintética. O intuito foi adequar a metodologia afim de definir volumes a serem utilizados, concentração do microrganismo, bem como avaliar as concentrações da curcumina efetivas contra as cepas de *C. albicans* e resultados subletais que possibilitassem a posterior análise do efeito sinérgico com os peptídeos. Dessa forma, foi selecionada como referência a concentração de 10 μ M para dar continuidade ao protocolo definitivo que está descrito a seguir.

A etapa de avaliação do efeito fotodinâmico foi realizada com as cepas de referência CaS e CaR. Para cada cepa, foi utilizada seis concentrações de curcumina (10, 8, 6, 4, 2, 1 μ M correspondente a 3,680, 2,944, 2,208, 1,472, 0,736, 0,368 μ g/mL respectivamente) e três de melitina (CIM, CIM $\frac{1}{2}$ e CIM $\frac{1}{4}$) (Figura 2) afim de estabelecer as concentrações de curcumina e melitina na PDI (associadas ou não) que possuísem efeito antimicrobiano nas cepas avaliadas.

As amostras planctônicas foram obtidas após o ajuste da concentração celular ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL), centrifugação, lavagem e ressuspensão em solução salina estéril (0,9%). A metodologia empregada foi semelhante ao teste de microdiluição para determinação da CIM, com algumas modificações para que possibilitasse a análise dentro do protocolo para efeito fotodinâmico. Inicialmente 100 μ L de H₂O ultra pura estéril foi adicionado às cavidades de placas de microdiluição. Em seguida, 100 μ L de melitina na concentração 4,4x maior que a CIM, foram adicionados na segunda linha da placa. As concentrações subsequentes foram obtidas após diluição seriada, pela transferência de 100 μ L do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da linha D, foram dispensados 100 μ L do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços. Em seguida, foi adicionado nos poços 100 μ L das soluções de curcumina preparadas previamente no dobro de cada concentração. Por fim, foram inseridos 20 μ L da suspensão fúngica em todos os poços. Além disso, poços adicionais receberam apenas curcumina e apenas melitina. Após a homogeneização do conteúdo dos poços com a ponteira estéril de pipeta, a placa foi mantida no escuro por 5 minutos.²⁸ Para cada condição foi realizado um poço por ocasião em 5 ocasiões distintas. Duas placas idênticas foram obtidas simultaneamente, sendo que uma foi utilizada para avaliação do efeito fotodinâmico da curcumina (iluminação com equipamento LED por 6,5 minutos para obtenção da dose de 18,3 J/cm²) e a outra foi utilizada para avaliação do efeito da curcumina sem luz (mantida no escuro por 6,5 minutos). O equipamento de iluminação (Biotable RGB) possuía 24 LEDs, os quais emitiam luz por baixo das amostras a uma distancia de +/- 1 cm. O equipamento possui um sistema de refrigeração com água para

evitar aquecimento. Diluições seriadas foram obtidas e semeadas em SDA, para possibilitar a determinação das UFC/mL como já descrito anteriormente.

Figura 2 - Representação da placa contendo as amostras do ensaio com células planctônicas



CUR: Curcumina; Mel: peptídeo; CIM: Concentração inibitória mínima da melitina

Fonte: Elaboração própria.

4.2.5.3 Análise de interação entre a melitina e a curcumina

Para avaliação da possível interação entre a melitina e a curcumina foi utilizado o método de microdiluição em tabuleiro (checkerboard) com algumas modificações para adequar ao protocolo da PDI. Nesta etapa, os experimentos foram realizados apenas com as cepas de referência. Após a aplicação dos tratamentos descritos na sessão anterior, as amostras foram transferidas da placa de microdiluição para eppendorfs e centrifugados em 5000rpm por 5 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio YNBg estéril. Então, as amostras foram transferidas para uma nova placa de microdiluição e incubadas por 24h a 37 °C. Após as 24h, a DO⁵⁴⁰ foi aferida.

4.2.6 Análise do efeito antimicrobiano sobre biofilmes

O protocolo para formação de biofilme foi baseado em Chandra et al.¹⁴⁷ com algumas modificações. Para isso, alíquotas de 150µL da suspensão fúngica padronizada em aproximadamente 10⁶ UFC/mL e ressuspensionadas em tampão fosfato-

salino (PBS) foram transferidas para os orifícios de uma placa de microtitulação com fundo chato (Kasvi), e a placa foi incubada em agitador orbital (90min/ 37°C/ 75rpm). Os orifícios foram lavados 2 vezes com 200µl de PBS estéril e, em seguida, 200µl meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) sem bicarbonato e tamponado com MOPS (Acido N-Morfolino Propano Sulfônico) (pH 7,0) foram adicionados nos orifícios e as placas foram mantidas por 48 horas em um agitador orbital (37°C/ 75 rpm) para o desenvolvimento dos biofilmes. Após esse período, os biofilmes maduros foram duplamente lavados com 200µl de PBS estéril e expostos aos tratamentos.

Os tratamentos consistiram na utilização de curcumina, melitina e associação de ambos, com e sem iluminação. Foram utilizadas três concentrações de curcumina (40, 20 e 10 µM correspondente a 14, 72, 7, 36, 3,68µg/mL respectivamente) e uma concentração de melitina (CIM), com base nos resultados da etapa em células planctônicas. O protocolo fotodinâmico foi o mesmo já descrito anteriormente. Após a realização dos tratamentos, o biofilme foi lavado 2 vezes com PBS e foi avaliada a viabilidade fúngica (UFC/mL). Para a quantificação da viabilidade, o biofilme foi desprendido do fundo por raspagem utilizando a ponta de pipeta por 30 segundos em cada poço. Em seguida, foram obtidas diluições seriadas a partir do conteúdo de cada orifício que foram semeadas em meio de cultura SDA. Após incubação a 37°C por 24 horas, o número de UFC/mL foi calculado. Para cada condição foi realizado um poço por ocasião em 5 ocasiões distintas.

Os experimentos com biofilmes foram repetidos para possibilitar análise da penetração da curcumina no biofilme por meio do Microscópio de Fluorescência Confocal (Carl Zeiss LSM 800 com Airyscan). As amostras dos biofilmes das cepas CaS e CaR foram expostas ao peptídeo melitina na concentração CIM de cada cepa individualmente em conjunto com a curcumina na concentração de 20µM por 5, 15 e 30 minutos. Após esse período, os biofilmes foram lavados com PBS para remoção das moléculas não aderidas e então levados ao microscópio confocal para leitura direta na placa de microdiluição. Uma outra amostra se manteve em contato com a melitina por 24h e então após esse período, mantida em contato com a curcumina por apenas 5 minutos. O mesmo processo de lavagem foi realizado. As leituras foram realizadas na objetiva de 10x com um campo representativo de cada amostra. O laser foi o 488nm com 10% de potência para todas as aquisições. A detecção espectral foi de 488 até 560 nm. Ganho de 700V com Z Stack.

4.2.7 Planejamento estatístico

Na etapa de caracterização Fotofísica com a presença de melitina as medidas de absorbância foram realizadas em equipamentos calibrados e sob supervisão de um pesquisador experiente nesse tipo de análise.

As medidas de UFC/mL foram realizadas por um pesquisador calibrado previamente. Para isso foi realizado estudo de reprodutibilidade no qual a pesquisadora examinou, em duplicata, 15 amostras de plaqueamento de cada cepa, com intervalo de um dia entre as avaliações. Para que as características da variável dependente não sofressem alteração, cada placa foi fotografada de forma padronizada. A concordância intraexaminador foi estimada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI)^{148,149}. Em função do valor obtido, o grau de concordância foi classificado segundo a proposta de Fermanian em 1984¹⁴⁸. Foi obtido o valor de 0,991 (intervalo de confiança 95%: 0,986 – 0,995), o qual é considerado 'excelente' segundo a proposta de Fermanian¹⁴⁸.

O projeto inicial previa a utilização de um tamanho amostral de 10 amostras em todas as etapas microbiológicas. Após a obtenção desses dados e suas estimativas de resumo, seria realizado cálculo formal do tamanho mínimo de amostra. No entanto, devido à interrupção dos experimentos durante um grande período de isolamento social imposto pela pandemia e também às dificuldades encontradas na definição de protocolos com o peptídeo LL-37 e posteriormente adequação para melitina, não houve tempo suficiente para realização de todos os experimentos previstos. Assim, nessa dissertação estão apresentados os resultados microbiológicos oriundos de cinco ocasiões distintas (n=5). Além disso, existe a intenção de se ampliar o estudo com algumas modificações de protocolo, especialmente para as análises em biofilme, a fim de se obter resultados mais satisfatórios. Por essa razão, o tamanho amostral poderá ainda ser aumentado nesses estudos futuros/ complementares.

Os dados obtidos na etapa de 'Caracterização Fotofísica' foram analisados descritivamente.

Os resultados da 'concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo melitina' foram analisados com estatística descritiva e análise de variância a um fator (melitina em oito níveis) com correção de Welch para heterocedasticidade, seguido do pós-teste de Games Howell.

Os dados de UFC/mL obtidos na etapa 'avaliação do efeito fotodinâmico sobre culturas planctônicas' foram analisados com estatística descritiva seguida de análise de

variância a dois fatores (i. curcumina em sete níveis; ii. melitina em quatro níveis) e pós-teste de Games-Howell quando necessário. Os dados também foram analisados por meio da análise da independência de Bliss¹⁵⁰⁻¹⁵⁴.

Os dados de absorbância obtidos na 'análise de interação entre a melitina e a curcumina' seriam inicialmente analisados com o índice de concentração inibitória fracionária (FICI) e análise da independência de Bliss¹⁵⁰⁻¹⁵⁴. Como as concentrações de melitina não promoveram inibição do crescimento fúngico no protocolo utilizado (fotodinâmico: controle sem luz), a realização da FICI foi inviabilizada. Assim optou-se pela realização apenas da análise de Bliss.

Os resultados obtidos na etapa da avaliação do 'efeito antimicrobiano sobre biofilmes' foram analisados com análise de variância a dois fatores (i. curcumina em quatro níveis; ii. melitina em dois níveis).

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram checados por meio do teste de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. Em algumas situações, houve ausência de um ou outro pressuposto, mas por se tratar de um delineamento fatorial em blocos balanceados, optou-se por manter a análise paramétrica por ela se mostrar robusta nesse cenário de dados. O nível de significância considerado para todas as análises foi de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se os programas Microsoft Excel versão 14 (Microsoft Office 2010) e IBM SPSS Statistics for Windows, versão 22.0 (Armonk, NY: IBM Corp.).

5 RESULTADOS

A seguir, os resultados estão subdivididos em estudo 1 e estudo 2.

5.1 Estudo 1

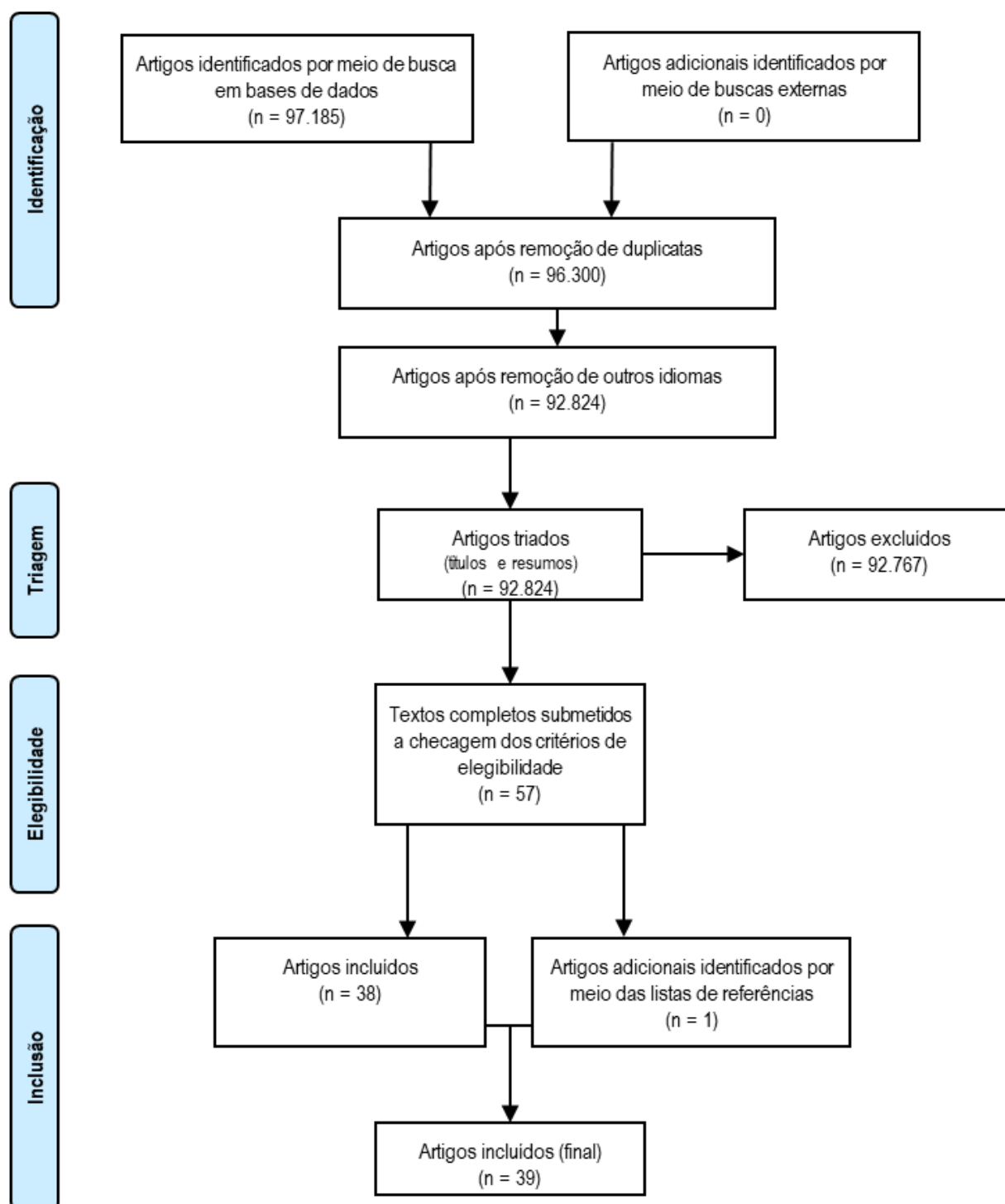
As buscas de literatura resultaram em 97.185 trabalhos, dos quais 885 estavam duplicados e 3.476 estavam em idiomas não aceitos. Assim, 92.824 estudos foram pré-selecionados para aplicação dos critérios de elegibilidade, o que resultou na seleção final de 39 trabalhos (Figura 3).

A publicação do primeiro estudo identificado a respeito da associação da PDI com peptídeos ocorreu no ano de 2000⁴¹ e, subsequente, houve um crescimento na quantidade de estudos, com exceção dos anos 2015 e 2016, nos quais não foram identificadas publicações (Figura 4).

Durante o processo de seleção dos trabalhos, foram identificadas 5 revisões de literatura, as quais foram utilizadas somente para checagem das referências. Todos os estudos identificados utilizaram delineamento laboratorial (in vitro) para a avaliação do efeito antimicrobiano. Em 14 estudos^{44,45,50,52-54,60,64,65,67,69,70,71,78} também foram descritos testes de citotoxicidade, e em outros 14^{44,53,54,56,64,65,69,70-75,77} também foram incluídas testagem in vivo.

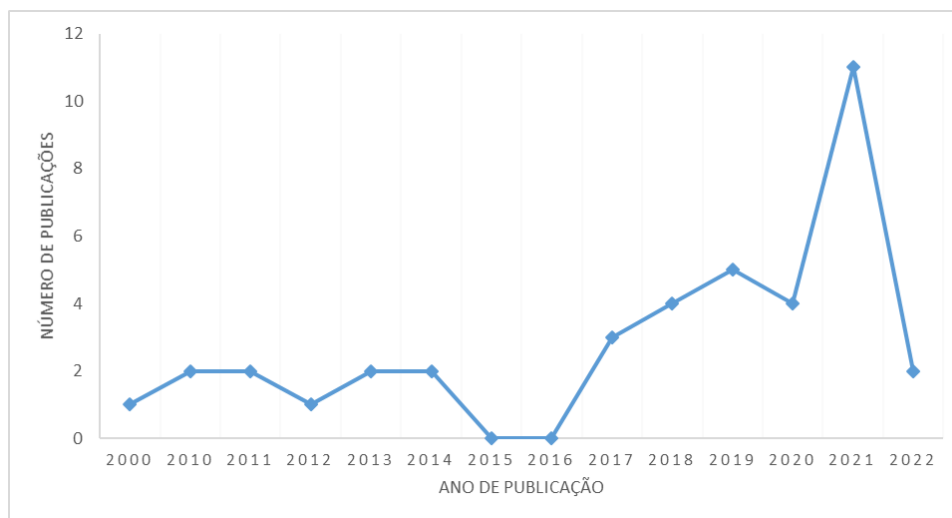
Dos estudos em que foram realizadas testagem in vivo, todos os 14 utilizaram modelo animal em camundongos para simulação de infecções. Dentre eles, foram identificados estudos com modelo animal de periodontite (1)⁶⁵, infecções de córnea (1)⁵⁵ e implantação de cateteres revistos por biofilme(1)⁴⁵. As análises mais realizadas foram análise histopatológica (9)^{44,55,56,64,65,69,70-72}, oito realizaram medidas de UFC/mL^{44,53,54,56,64,69,75,77} e 4 realizaram análises a partir de amostras sanguíneas^{44,55,73,74}.

Figura 3 - Diagrama de fluxo PRISMA ilustrando a estratégia de busca. Este fluxograma apresenta as fases de identificação e seleção dos artigos, que resultaram na identificação de 39 artigos considerados elegíveis para inclusão na revisão



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Número de publicações sobre PDI em associação com peptídeos identificadas até o ano de 2022



Fonte: Elaboração própria.

Com relação aos microrganismos investigados, dos 39 estudos incluídos, 29 testaram o efeito antimicrobiano sobre culturas de *Staphylococcus aureus* (Tabela 1), em seguida, *Escherichia coli* com 25 estudos (Tabela 2) e *Pseudomonas aeruginosa* com 14 (Tabela 3). Outras espécies apareceram com menor frequência (Tabela 4) como, por exemplo, *Staphylococcus epidermidis* (4 estudos), *Enterococcus faecalis* e *C. albicans* (3 estudos) e *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (2 estudos).

A maioria dos trabalhos (25 artigos) realizaram a associação das duas terapias por meio de conjugação, ou seja, realizaram a união das moléculas do FS e do PAM através de uma ligação química. O FS mais utilizado nas conjugações foi a porfirina e seus derivados (porfirina, protoporfirina, isômero de porfirina, tetrafenilporfirina de zinco e 5[4'-carboxifenil]-10,15,20-trifenilporfirina) (12)^{42,43,49,50-52,60,62,66,73,78,79}. O segundo em maior número foi o FS de segunda geração Clorina e6 (4)^{61,64,65,69}. Na sequência foram encontrados estudos com ftalocianina e seus derivados (3)^{46,74,75}, Eosina Y (2)^{58,59}, AIEgens (2)^{77,80}, e por fim Rutênio (1)⁶⁸ e clorofila (1)⁴⁴. Com relação aos peptídeos, observou-se grande variabilidade, entretanto os que mais se destacaram foi polimixina B (3)^{61,62,80}; KLAKLAK (3)^{58,59,73} Apidaecidina-1b (2)^{49,50}; TAT (2)^{43,65} e Buforina-2 (2)^{51,68}.

De forma geral, os conjugados FS + PAM demonstraram boa eficácia contra os microrganismos estudados. No caso do conjugado de clorina e6 e polimixina B em Le Guern et al.⁶¹ apenas o FS já causou resultado antimicrobiano compatível ao da conjugação⁶¹. Os conjugados apresentados por Polo et al.⁴² (Porfíceno e Polilisina) e Dosseli et al.⁵¹ (Porfirina e Buforina2/magainina2) mostraram efeito de morte contra

linhagens celulares de fibroblastos, chamando atenção para a possível citotoxicidade da associação dos compostos. Além disso, em três estudos os conjugados não obtiveram sucesso, em Vince et al.⁷⁸ (Porfirina e PEP12) contra *E. coli*; Yang et al.⁷⁹ (Temoporfirina e WLBU2) contra *P. aeruginosa* e em Bao et al.⁸⁰ (AlEgen e Polimixina B) contra *E. faecalis* e *S. mutans*.

Quatro estudos avaliaram a atividade das terapias sem união química, ou seja, utilizaram o FS na presença do PAM. Dentre esses estudos os FS que mais utilizados foram a curcumina (2)^{47,76} azul de metileno e clorina Ce6 (2)^{47,48} e por fim a rosa-bengala (1)⁶⁷. Já os PAMs utilizados foram monômero e dímero de aureína 1,2 (2)^{47,48}, camel e pexiganan 9 (1)⁶⁷ e polimixina B (1)⁷⁶. Em todas as associações, o efeito antimicrobiano foi potencializado, exceto em Defreitas et al.⁴⁷ contra *E. faecalis* no qual a combinação da curcumina com o peptídeo Aureína 1.2 melhorou sutilmente a redução bacteriana em comparação PDI mediada pela curcumina, mas não em comparação com o peptídeo sozinho⁴⁷.

Também foi identificado 1 estudo⁵⁶ no qual o peptídeo polimixina B atuou como o próprio FS. Nesse trabalho foram utilizadas amostras de *E. coli* resistente à canamicina e os autores mostraram que o valor de UFC/mL diminui 3,9 ordens de magnitude em relação aos microrganismos não irradiados⁵⁶.

Por fim, 9 artigos avaliaram outras formas de associação. Por exemplo, Zhang et al.⁷², Cai et al.⁴⁵ e Wang et al.⁷¹ realizaram formulações com géis a base de peptídeo com o fotossensibilizador incorporado. Além de associações com diferentes moléculas como a betaciclodextrina (um carboidrato)⁵⁵, nanocristais de celulose⁶³ nanopartículas⁴³ e nanopartículas de oligômeros⁵⁷. Outras formas de união química entre FS e peptídeo também foram realizadas em Qiu et al.⁷⁰ e Gao et al.⁵⁴.

Tabela 1- Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Staphylococcus aureus*

(continua)

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Polo2000	MRSA 110	Meticilina	Porfíriceno (isômero da porfirina)	Pdilisina*	Houve efeito de morte em função do tempo de irradiação do conjugado.
Dosseli2010	ATCC BAA 44	Meticilina	5 (4'-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (cTPP)	Apidaecina 1b*	O efeito de morte do FS foi potencializado com o uso do conjugado.
Bourré2010	8325-4	Não informado	Porfirina	Tat GRKKRRQRRRPPQ*	Após irradiação, o efeito foi dependente da concentração do conjugado. As espécies Gram (+) foram mais sensíveis do que as espécies Gram (-).
Vince2011	MRSA	Meticilina	Porfirina	PEP12 CGPGSGREHARGVRGGPC*	Após irradiação com luz vermelha, houve diminuição no crescimento desta cepa.
Yang2011	DSM11729	Meticilina	Temoporirina	WLB2*	Houve efeito de morte em função da concentração de temoporirina.
Johnson2013	ATCC 29213	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da ação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Dosseli2013	MRSA	Meticilina	Porfirina	Apidaecina 1b*	O efeito de morte dependeu do tipo de conjugado porfirina+apidaecina 1b. Diferentes tempos de incubação não resultou em grandes diferenças.
Johnson2014	ATCC 29213	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	O objetivo foi explicitar como este conjugado atua nos microorganismos estudados, já que "Johnson2013" demonstrou a eficácia do conjugado contra as cepas em questão.
Dosseli2014	ATCC BAA-44	Meticilina	Porfirina	Buforina 2 e magainina 2*	Houve efeito de morte maior para o conjugado com magainina do que com a buforina. O teste aPDT com fibroblastos em concentrações pequenas e menores tempos de incubação induziram a morte completa das células.
Leguem2017 ¹	CIP7625	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte igual para o FS sozinho e para o conjugado.
Leguem2017 ²	Não informado	Não informado	Porfirina	Polimixina B*	Em relação ao conjugado produzido em "Leguem2017 ¹ ", este novo composto apresentou pouca influência contra esta cepa.
Leguem2017 ³	CIP7625	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B****	O nanocristal de celulose ligado a clorina sozinha, e o nanocristal + clorina + peptídeo tiveram efeito fotobactericida.
Cai2018	Não informado	Não informado	Clorofila	Purpurin 18*	O conjugado apresentou morte específica de <i>S. aureus</i> , e MIC 4x menor que a vancomicina. Também apresentou eficiência terapêutica em modelos de infecção em camundongos.
Zhang2018†	Não informado	Multiresistente	Derivado de fullereno (C60 pirrolidina Tris-ácido, C60-PTC)	Fmoc-FF****	Após irradiação, nenhuma colônia de bactérias foi observada no grupo tratado com o conjugado e apenas 42% das bactérias foram mortas pela solução apenas com o FS.
Gao2019	Não informado	Meticilina	Ce6 foi enxertado em α -ciclodextrina	Magainina 1 conjugado com polietilenoglicol****	Apenas com o FS já houve redução bacteriana, porém quando utilizado o conjugado peptídeo + FS a redução foi ainda maior.
Zhang2019†	CMCC (B) 26003	Não informado	Protoporfirina IX (PpIX)	(KLAKLAK) 2*	Houve efeito de morte com o conjugado peptídeo + FS maior do que quando usado apenas o FS sozinho. Também apresentou eficiência terapêutica em modelos de infecção em camundongos.
Defreitas2019	ATCC 25923	Sem resistência	Azul de metileno e clorina Ce6	Monômero e dímero de aureína 1,2**	Houve inibição no processo de formação de biofilme.

Tabela 1- Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Staphylococcus aureus* (conclusão)

Zhao2020	Não informado	Não informado	Ftalocianina de silício (SiPc)	Tri-arginina (oligopeptídeos)*	O efeito bactericida foi dose-dependentes. O conjugado apresentou maior efeito para esta espécie. Também apresentou eficiência terapêutica em modelos de infecção em camundongos.
Lei2020†	ATCC 6538	Sem resistência	Clorina e6	Tet213 (KRWWKWWRR)*	Um conjugado específico (AMP2-Ce6) mostrou atividade antibacteriana com um valor de MIC em torno de 3,2 µM sem foto-irradiação e <0,1 µM após irradiação, além do efeito em infecção em camundongos.
Jiang2020	ATCC 6538	Sem resistência	-	Polimixina B***	A eficiência de morte do peptídeo melhorou em 3,9 ordens de magnitude na luz em comparação com o escuro.
Cai2021†	ATCC 43300	Meticilina	Indocianina verde (ICG) e MnBr(CO) 5	Nanogel à base de dendrímero de peptídeo (G3KBPY)****	Após a irradiação a laser a atividade antibacteriana foi aumentada em relação aos controles (sem luz, apenas FS e apenas peptídeo).
Cai2021†	ATCC 25922	Não informado	Indocianina verde (ICG) e MnBr(CO) 5	Nanogel à base de dendrímero de peptídeo (G3KBPY)****	Após a irradiação a laser a atividade antibacteriana foi aumentada em relação aos controles (sem luz, apenas FS e apenas peptídeo).
Jiang2021	Não informado	Não informado	-	Polimixina B****	Conjugaram nanopartículas de oligômero com o peptídeo. Para esta espécie, a taxa de sobrevivência não foi afetada pelo conjugado sem luz e com luz.
Judzewitsch2021	Não informado	Não informado	Tetrafenil porfirina de zinco (ZnTPP)	Miméticos de peptídeo*	Foram sintetizados vários polímeros diferentes. Após irradiação todos mostraram eficácia. Nos polímeros de maior peso molecular, a irradiação de luz foi menos influente.
Qiu2021‡†	ATCC 6538	Sem resistência	Clorina e6	GKRWWKWWRR****	Após irradiação, as células foram completamente erradicadas.
Qiu2021†	ATCC 6538	Sem resistência	Clorina e6	GKRWWKWWRR*	Houve efeito inibitório no crescimento desta cepa de maneira dependente da concentração e do tempo de irradiação. Esta espécie se mostrou mais sensível em comparação a E.coli.
Zhang2021†	ATCC 6538	Sem resistência	Ftalocianina lipofílica	RWRWRW*	Sob iluminação, induziu redução de até 5 log desta cepa
Zhang2021†	ATCC 33591	Meticilina	Ftalocianina lipofílica	RWRWRW*	Sob iluminação, induziu morte semelhante ao observado na cepa sem resistência.
Chu2021	ATCC 25923	Sem resistência	Ftalocianina	RRLCRIVWVIRVCRR*	Após iluminação, este conjugado exibiu uma redução de 10 ⁵ vezes em UFC/mL
Chu2021	19-364714	Meticilina	Ftalocianina	RRLCRIVWVIRVCRR*	Contra o isolado clínico, a redução foi ligeiramente inferior ao da cepa tipo ATCC.
Wang2022†	ATCC 6538	Sem resistência	Sulfeto de cobre	GIKKIKIKIKIGRADARADARADA-NH2****	Sintetizaram um hidrogel a base de peptídeo com nanopontos de sulfeto de cobre. O hidrogel foi capaz de matar as bactérias de maneira dependente da concentração além de inibir em 90% a formação de biofilme.
Guo2022†	Não informado	Sem resistência	AlEgens	HHC36(AMP), ditriptofano (W2), poliarginina(R18) e polilisina(K18)*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta cepa após irradiação
Guo2022†	MRSA	Meticilina	AlEgens	HHC36(AMP), ditriptofano (W2), poliarginina(R18) e polilisina(K18)*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta cepa após irradiação com excessão do ALENF+AMP

*: União química entre FS e peptídeo

**: Associação simples entre FS e peptídeo

***: Peptídeo como fotossensibilizador

****: Outras formas de associação entre as moléculas

†: Estudos que realizaram testes in vivo

-: Não foi utilizado FS

Fonte: Elaboração própria

Tabela 2 - Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Escherichia coli*

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Polo2000	O4	Não informado	Porfíreno (isômero da porfírina)	Polilisina*	Esta espécie foi menos fotossensível que as gram-positivas. Em concentrações aumentadas houve perda de 95% na viabilidade celular. Nestas concentrações houve extensa diminuição na sobrevivência de fibroblastos.
Dosse li2010	ATCC 25922	Não informado	5(4'-carboxifenil) -10,15,20-trifenilporfírina (CTPP)	Apidaecina 1b*	Houve efeito de morte após irradiação, com redução de 3-4 log ₁₀ , sendo que nem o FS nem o peptídeo, sozinhos ou associados (sem ligação química), mostraram atividade bactericida após a iluminação.
Boumé2010	ATCC 25922	Não informado	Porfírina	Tat (GRKKRRQRRRPPQ)*	Após irradiação, o efeito bactericida em todas as espécies foram dependentes da concentração de Tat-porfírina.
Vince2011	Não informado	Não informado	Porfírina	PEP12 CGPGSG REHARGVRRG PC*	Não houve efeito de morte após incubação e irradiação como conjugado.
Liu2012	ATCC 53868	Sem resistência	Proto-Porfírina	AMP YD3WF*	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Liu2012	BL21	Ampicilina	Proto-Porfírina	AMP YD3WF*	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Johnson2013	BL21 DE3	Ampicilina	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da fotoinativação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Dosse li2013	ATCC 25922	Não informado	Porfírina	Apidaecina 1b*	Testaram vários conjugados diferentes. Todos tiveram efeitos dependentes da concentração e eficiência que depende do tipo de conjugado. Testaram diferentes tempos de incubação mas em geral não afetou o resultado de morte.
Johnson2014	BL21 DE3	Ampicilina	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	Este artigo teve como objetivo explicitar como o conjugado atua nos microrganismos estudados, já que um artigo do mesmo grupo um ano antes provou a eficácia do conjugado.
Dosse li2014	ATCC 25922	Não informado	Porfírina	Buforina 2 e megaína 2*	Houve efeito de morte maior para o conjugado com megaína do que com a buforina. O teste aPDT com fibroblastos em concentrações pequenas e menores tempos de incubação induziram a morte completa das células.
Leguern2017 [†]	CIP54.8T	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte na conjugação peptídeo + FS. Nesta espécie, só o FS não causou atividade.
Leguem2017 [‡]	Não informado	Não informado	Porfírina	Polimixina B*	Em relação ao conjugado produzido em "Leguem2017*", este novo composto apresentou eficácia semelhante ao antigo estudo contra esta espécie.
Leguem2017 [§]	CIP54.8T	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B****	O nanocristal de celulose ligado a clorina + peptídeo foi mais eficiente para esta cepa do que apenas o nanocristal + clorina.
Zhang 2019 [†]	MG1655	Não informado	Protoporfírina IX (PPIX)	(KLAKLAK) 2*	Houve efeito de morte com o conjugado peptídeo + FS maior do que quando usado apenas o FS.
Zhao2020 [†]	Não informado	Não informado	Ftalocianina de silício (SiPC)	Tri-arginina (oligopeptídeos)*	O efeito de morte do conjugado foi dose-dependente e sem toxicidade escura. Este conjugado possuiu maior captação por parte da célula e geração de EROs.
Pierce2020	MG1655	Sem resistência	Rutênio	Buforina 2*	Sem irradiação, tanto a buforina 11 sozinha quanto o conjugado mostraram a mesma MIC. Quando adicionado a irradiação de luz o conjugado mostrou decréscimo de 32 vezes em sua MIC.
Pierce2020	AR 0114	Carbapenêmicos e Quinolonas	Rutênio	Buforina 2*	Sem irradiação, o conjugado foi mais ativo que a buforina 2 sozinha.
Jiang 2020	BL21	Canamicina	-	Polimixina B****	Valor de UFC/ml tratado com o peptídeo diminui 3,9 ordens de magnitude na luz em comparação como escuro.
Bao2021	Não informado	Não informado	AlEgen AlE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B*	Houve certa toxicidade escura para esta espécie e após a irradiação com luz branca houve uma letalidade bacteriana de mais de 95%.
Cai2021 [†]	ATCC 25923	Não informado	Indocianina verde (ICG) e MnBr(CO) 5	Nanogel à base de dendrímero de peptídeo (G3KBPY)****	Após a irradiação a laser a atividade antibacteriana foi aumentada em relação aos controles.
Jiang 2021	Não informado	Canamicina	-	Polimixina B****	Conjugaram nanopartículas de oligômero como peptídeo. Para esta espécie, a UFC/ml tratada com o conjugado diminuiu cerca de 3,8 ordens sob irradiação em comparação com o escuro.
Qiu2021 [‡]	ATCC 8739	Não informado	Clorina e6	GKRWWKWWRR****	Após irradiação o efeito antibacteriano foi significativamente maior.
Qiu2021 [†]	ATCC 25922	Não informado	Clorina e6	GKRWWKWWRR*	Houve efeito de morte em função da concentração e do tempo de irradiação. Esta espécie se mostrou menos sensível em comparação com <i>S. aureus</i> .
Zhang 2021 [†]	ATCC 8739	Não informado	Ftalocianina lipofílica	RWRWRW*	Sob iluminação houve redução de 3 log em baixa concentração (2 µM).
Chu2021	ATCC 25922	Não informado	Ftalocianina	RRLCRIVWVIRVCR*	Após irradiação, a eficiência de morte foi significativamente aumentada.
Chu2021	19-117441	Não informado	Ftalocianina	RRLCRIVWVIRVCR*	Os resultados para o isolado clínico são semelhantes a cepa ATCC.
Wang 2022 [†]	ATCC8739	Não informado	Sulfeto de cobre	GIKKIKKKIGRADARADARADA-NH2****	Sintetizaram um hidrogel a base de peptídeo com nanopontos de sulfeto de cobre. O efeito foi dependente da concentração. Foi mais eficiente para esta espécie do que para <i>S. aureus</i> .
Guo2022 [†]	Não informado	Não informado	AlEgens	HH36(AMP), ditriptofano (W2), polilisinina (PLB) e polilisina (KLB)*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta espécie após irradiação.

*: União química entre FS e peptídeo

**: Associação simples entre FS e peptídeo

***: Peptídeo como fotossensibilizador

****: Outras formas de associação entre as moléculas

†: Estudos que realizaram testes in vivo

-: Não foi utilizado FS

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Bourré2010	PA01	Não informado	Porfirimina	Tat GRKKRRQRRRPPQ*	Após irradiação, o efeito bactericida foi dependente da concentração de Tat-porfirimina.
Dosseli2010	ATCC 25668	Não informado	5 (4'-carboxifenil) -10,15,20-trifenilporfirimina (cTPP)	Apidaecina Ib*	Houve redução de 2 log ₁₀ de UFC/mL utilizando concentrações maiores do que para outras espécies, e nenhuma fotodestruição aconteceu para peptídeo e FS sozinhos.
Yang2011	DSM1117	Não informado	Temoporfirina	WLB2 *	Este conjugado apresentou pouco efeito tóxico sobre este microorganismo.
Johnson2013	ATCC 27853	Não informado	Eosina Y	{KLAKLAK} 2*	O efeito bactericida do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Leguerm2017 [†]	CIP76110	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte na conjugação peptídeo + FS. Apenas o FS não causou efeito.
Leguerm2017 [‡]	Não informado	Não informado	Porfirimina	Polimixina B*	Em relação ao conjugado produzido em "Leguerm2017" [†] , este novo composto apresentou eficácia semelhante ao antigo estudo.
Leguerm2017 [§]	CIP76110	Não informado	Porfirimina	Polimixina B****	O nanocristal de celulose ligado a clorina + peptídeo foi mais eficiente do que apenas o nanocristal + clorina.
Nakoneczna2018	ATCC 10145	-	Rosa - bengala	CAMEL e pexiganan 9**	Houve efeito de morte após a associação peptídeo + FS + irradiação.
Nakoneczna2018	35 isolados clínicos	14 eram multiresistentes	Rosa - bengala	CAMEL e pexiganan 9**	A combinação pexiganan 9 + aPDT inativou quase todos os isolados clínicos, com exceção de apenas um.
Gao2019	Não informado	Não informado	Clorina e6	Magainina 1 conjugado com polietilenoglicol****	Após a irradiação, apenas o FS exibiu efeito de inativação do biofilme, porém o conjugado AMP-FS foi mais eficaz.
Pierce2020	AR 0229	Cefalosporina e quinolonas	Rutênio	Buforina 2 *	O conjugado foi eficaz contra essa espécie, tendo um aumento na sua atividade de ≥32 vezes
Han2020 [†]	Não informado	Não informado	Clorina e6 (Ce6) conjugada com β-ciclodextrina	{YGRKKRRQRRR-GPLGVRG-EEEEEE}****	Os peptídeos continham a função de não deixar o conjugado aderir a células não bacterianas e também melhoraram a eficácia antibacteriana da aPDT.
Gao2021 [†]	ATCC 27853	Não informado	Clorina e6	Poli-peptídeo catiônico (Pep) ****	Houve efeito de morte em função da concentração e do tempo de irradiação. Também foi capaz de erradicar biofilme.
Judzewitch2021	Não informado	Não informado	Tetrafenil porfirimina de zinco (ZnTPP)	Miméticos de peptídeo*	Sintetizaram vários polímeros diferentes. Todos os conjuntos de polímeros apresentaram efeito após irradiação, com exceção de "P1-3".
Zhou2021	ATCC.9027	Não informado	Curcumina	Polimixina B**	A combinação de polimixina B e aPDT mediada por curcumina mostrou atividade bactericida significativamente maior em comparação com curcumina ou polimixina B.

*: União química entre FS e peptídeo

**: Associação simples entre FS e peptídeo

***: Peptídeo como fotossensibilizador

****: Outras formas de associação entre as moléculas

†: Estudos que realizaram testes in vivo

-: Não foi utilizado FS

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de diferentes espécies

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESECHO
Johnson2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Multimista	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da fotoinativação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Pierce 2020	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Multimista	Rutênio	Euforina 2 *	Sem irradiação, o conjugado foi mais ativo que a euforina 2 sozinha.
Polo 2000	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Não informado	Porfírico (isômero da porfírina)	Polilisina *	O conjugado não teve efeito tóxico no escuro, enquanto uma inativação eficiente foi induzida pela exposição à luz na concentração de 1 µM.
Pierce 2020	<i>Bacillus subtilis</i>	Não informado	Rutênio	Euforina 2 *	Sem irradiação, o conjugado já foi 4 vezes mais ativo que o peptídeo sozinho. Após irradiação o conjugado mostrou decréscimo na MIC de 16 vezes.
Polo 2000	<i>Candida albicans</i>	Não informado	Porfírico (isômero da porfírina)	Polilisina *	O conjugado não teve efeito tóxico no escuro, enquanto uma inativação eficiente foi induzida pela exposição à luz na concentração de 1 µM.
Zhao2020†	<i>Candida albicans</i>	Não informado	Ftalocianina de silício (SiPC)	Tri-arginina (oligopeptídeos) *	Houve efeito de morte dose-dependente e dificilmente tóxico no escuro. Comparado com os controles do estudo, possuiu maior captação por parte da célula e geração de EROs.
Jiang 2021†	<i>Candida albicans</i>	Não informado	-	Polimixina B****	Conjugaram nanopartículas de oligômero como peptídeo. Para esta espécie, a taxa de sobrevivência não foi afetada pelo conjugado sem luz e com luz.
De Freitas 2018	<i>Enterococcus faecalis</i>	Resistente mas não especificado	Azul de metileno, curcúmina e clorina-e6	Aureína 1,2**	A combinação de CUR-PDI com AU melhorou um pouco a redução bacteriana em comparação com CUR-PDI sozinho, mas não em comparação com AU sozinho. A combinação de AU com Ce6-PDI e MB-PDI, levou a eliminação total de bactérias.
De Freitas 2019	<i>Enterococcus faecalis</i>	Não informado	Azul de metileno e clorina Ce6	Monômero e dímero de aureína 1,2**	A terapia combinada, especificamente com PDI e o dímero de aureína, inibiu o processo de formação de biofilme. O ácido lipotéico é o ponto de ancoragem de ambos os peptídeos na parede celular de E. faecalis.
Bao 2021	<i>Enterococcus faecalis</i>	Não informado	AIEgen AIE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B *	Nesta espécie, a adição do conjugado sem luz não alterou em nada a sobrevivência. Mesmo após a irradiação, ainda não houve efeito de morte.
De Freitas 2019	<i>Enterococcus faecium</i>	Não informado	Azul de metileno e clorina Ce6	Monômero e dímero de aureína 1,2**	A terapia combinada, especificamente com PDI e o dímero de aureína, inibiu o processo de formação de biofilme.
Liu2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicilina	Proto-Porfirina	AMP Y D 3WF *	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Pierce 2020	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	β-lactâmicos e aminoglicosídeos	Rutênio	Euforina 2 *	O conjugado foi eficaz contra essa cepa, tendo um aumento na sua atividade de 216 vezes.
Feese 2019	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Não informado	Porfírina	Diversos peptídeos diferentes *	Toda a série de conjugados testados foram classificados como excelentes FS (inativação de 3-4 unidades logarítmicas) para concentrações tão baixas quanto 0,25 ou 0,5 µM.
Li 2021†	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não informado	Clorina-e6	TAT (HQQYGRKKRRQRRQ-NH2) *	No escuro, o conjugado não influenciou a proliferação da P. gingivalis, porém após irradiação inibiram notavelmente a proliferação do microrganismo.
Liu2012	<i>Salmonella enterica</i>	Não informado	Proto-Porfirina	AMP Y D 3WF *	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Bao 2021	<i>Salmonella enteritidis</i>	Não informado	AIEgen AIE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B *	Houve toxicidade escumacerta ponto para esta cepa após a irradiação com luz branca houve uma letalidade bacteriana extremamente alta.
Johnson2013	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da fotoinativação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Legueman2017*	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B****	O nanocristal de celulose ligado a clorina sozinha, e o nanocristal + clorina + peptídeo tiveram efeito fotobactericida.
Legueman2017†	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B *	Houve efeito de morte na conjugação do peptídeo + FS (diminuição de 6 unidades logarítmicas) mas só com o FS já houve morte igual.
Guo2022†	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	AIEgens	HHC36(AMP), ditriptofano (W2), poliarginina (R18) e polilisina (K18) *	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta cepa após irradiação com excessão do AIEFP+AMP.
Bao 2021	<i>Streptococcus mutans</i>	Não informado	AIEgen AIE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B *	Nesta cepa, a adição do conjugado sem luz não alterou a sobrevivência. Mesmo após a irradiação, ainda não houve efeito de morte.
Bourré 2010	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Não informado	Porfírina	Tat GRKKRRQRRRPQ *	Após irradiação, o efeito bactericida em todas as espécies foram dependentes da concentração de Tat-porfirina.

*: União química entre FS e peptídeo

** : Associação simples entre FS e peptídeo

***: Peptídeo como fotossensibilizador

****: Outras formas de associação entre as moléculas

†: Estudos que realizaram testes in vivo

-: Não foi utilizado FS

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Estudo 2

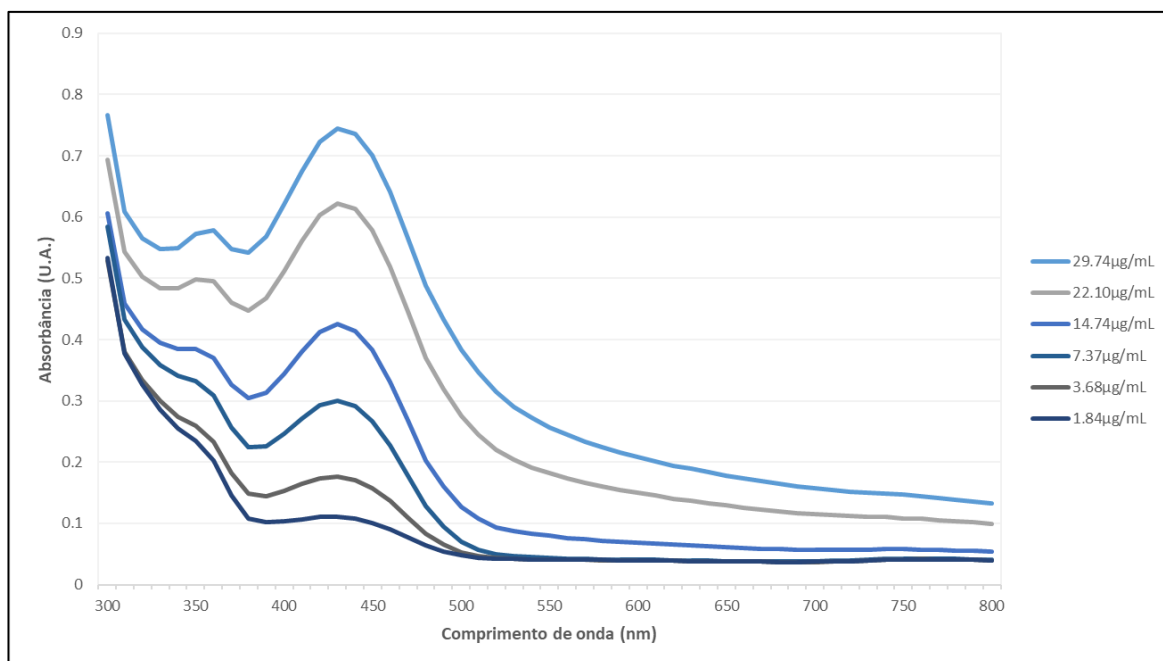
Os resultados do estudo 2 estão subdivididos de acordo com cada experimento laboratorial realizado.

5.2.1 Caracterização fotofísica

Os espectros de absorção da curcumina estão mostrados na Figura 5. Os dados obtidos são resultado da média de duas ocasiões independentes. Nota-se que a absorção de luz da curcumina ficou predominantemente entre 400 e 470 nm.

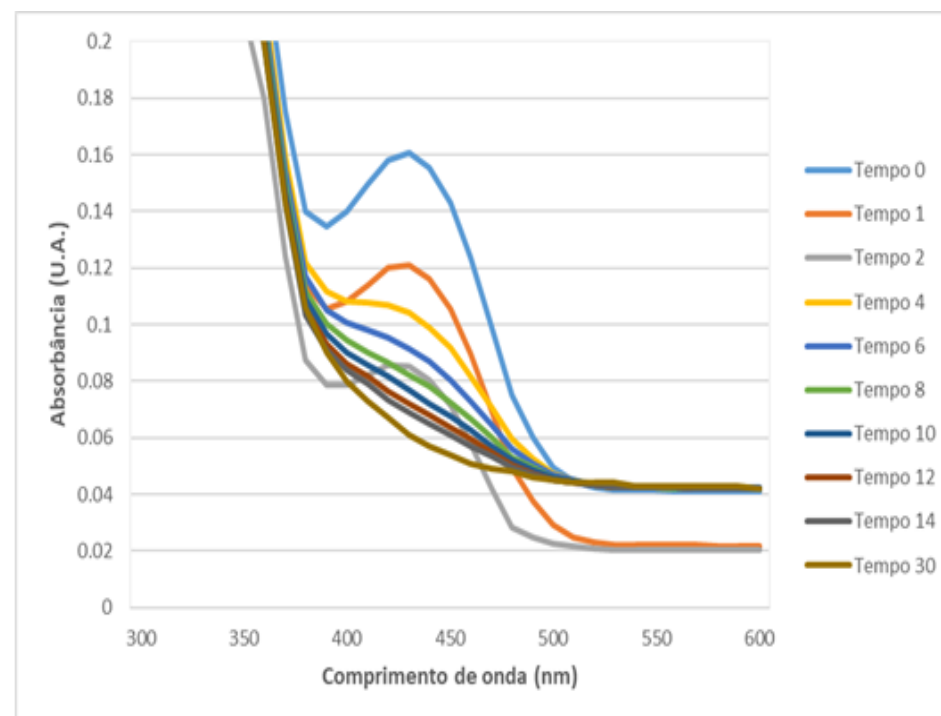
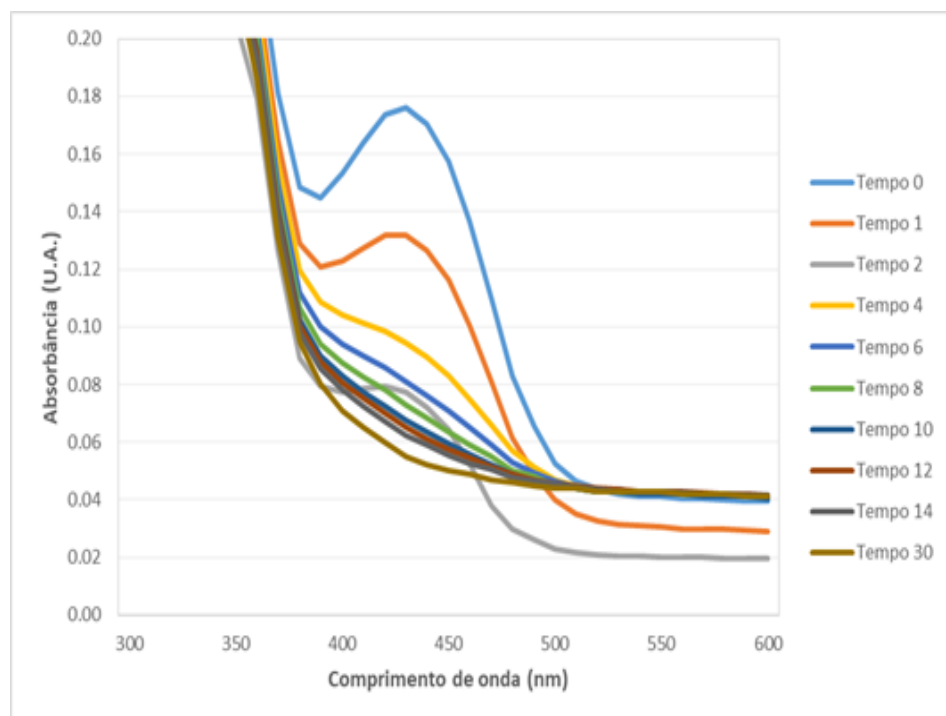
Quando as amostras foram iluminadas notou-se que a absorbância da curcumina diminuiu rapidamente em função do tempo de iluminação, sendo que após 4 minutos já não se observa mais o pico que existia antes da aplicação de luz (Figura 6A). Quando associada à melitina (Figura 6B) observou-se comportamento semelhante em comparação com a curcumina sozinha. O pico de absorção de luz da curcumina ocorreu em 430nm independente da sua associação ou não com o peptídeo.

Figura 5 - Espectros de absorção da curcumina em diferentes concentrações (29,74; 22,10; 14,74; 7,37; 3,68 e 1,84 $\mu\text{g/mL}$ que correspondem a 5, 10, 20, 40, 60, 80 μM , respectivamente)



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Espectros de absorção da curcumina na concentração de $3,68\mu\text{g/mL}$ em função do tempo de iluminação em minutos com equipamento LED no comprimento de onda $\sim 460\text{nm}$. A: apenas curcumina; B: curcumina associada à melitina $62\mu\text{g/mL}$



Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Determinação da CIM/CFM dos peptídeos para cada cepa avaliada

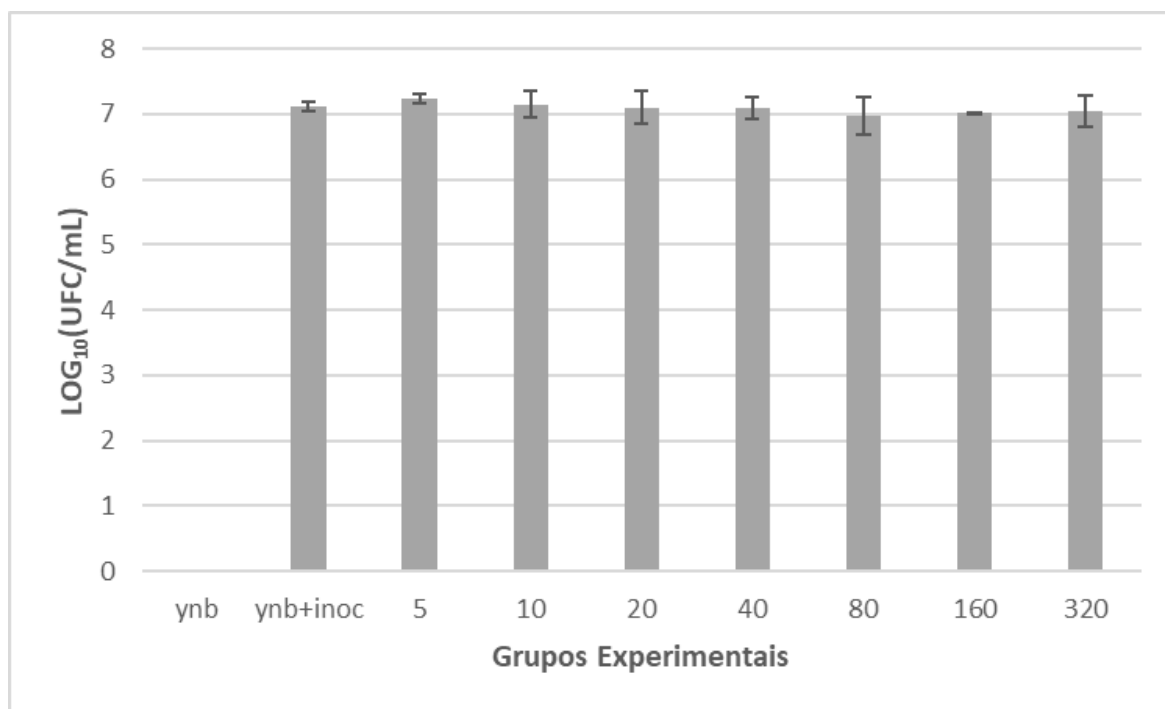
A seguir, os resultados estão subdivididos de acordo com o peptídeo utilizado.

5.2.2.1 Resultados utilizando o peptídeo LL-37

A determinação da CIM/CFM foi iniciada com a cepa susceptível ao fluconazol (CaS) utilizando o peptídeo LL-37. Foram realizadas duas ocasiões do protocolo de CIM/CFM (n=4), entretanto não foi verificado efeito antimicrobiano do peptídeo LL-37 (Figura 7).

Uma ocasião adicional foi realizada com a utilização de uma nova remessa do peptídeo, bem a comparação com grupos nos quais o LL-37 foi solubilizado em solução salina ao invés de meio de cultura YNBg. Além disso, foi incluída a clorexidina como controle positivo. Os resultados estão na Figura 8, na qual pode ser verificado que novamente não houve efeito do LL-37.

Figura 7 - Valores médios (n=4) e desvio-padrão dos valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) obtidos para a cepa susceptível de *C.albicans* (CaS 90028) após o tratamento com o peptídeo LL-37



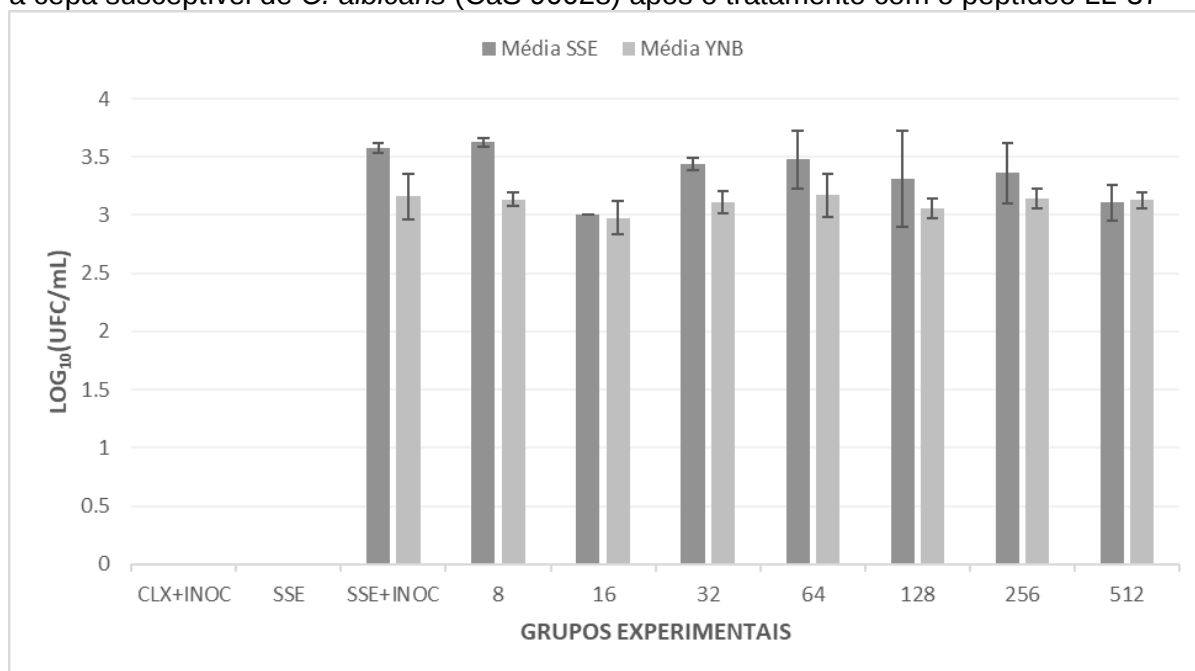
* 320 à 5: referem-se às concentrações do peptídeo LL-37 em $\mu\text{g/mL}$.

** YNB + Inoc (controle negativo): amostras microbianas expostas ao meio de cultura YNBg.

*** YNB: controle de esterilidade: somente meio de cultura YNBg.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Valores médios (n=2) e desvio-padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos para a cepa susceptível de *C. albicans* (CaS 90028) após o tratamento com o peptídeo LL-37



* 512 à 8: referem-se às concentrações do peptídeo LL-37 em $\mu\text{g/mL}$.

** SSE + Inoc: controle negativo: amostras microbianas expostas à solução salina estéril ou meio de cultura YNBg.

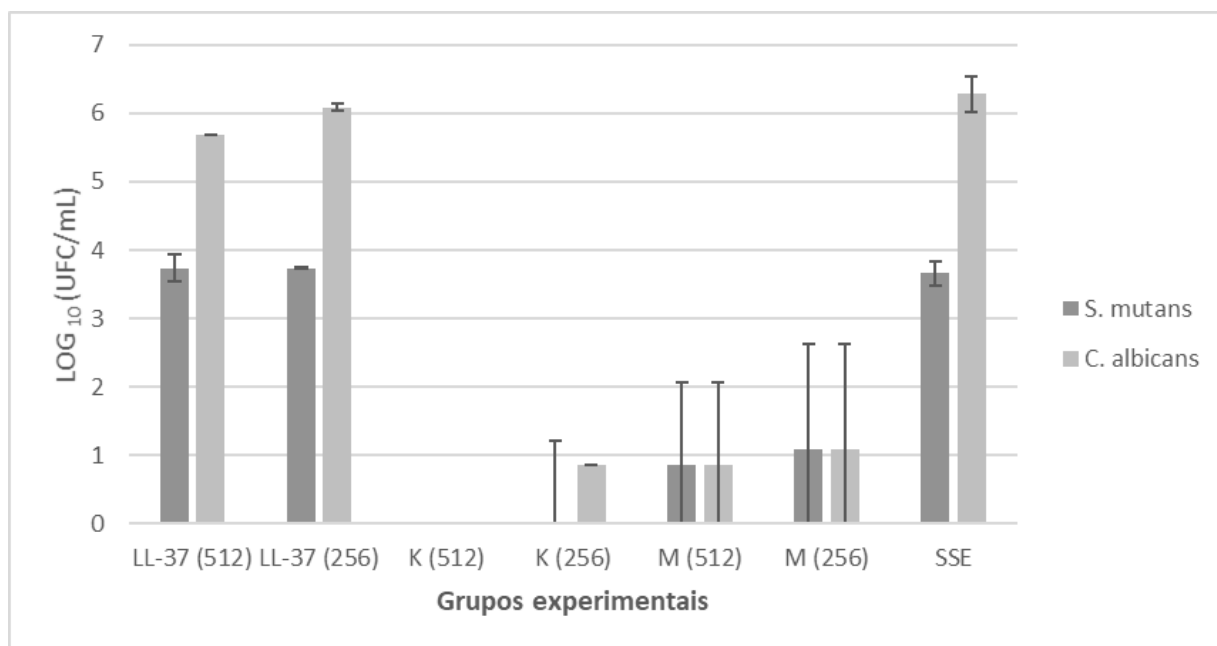
*** SSE: controle de esterilidade.

**** CLX+ Inoc: controle positivo: amostras com solução microbiana expostas à solução de clorexidina 0,12%.

Fonte: Elaboração própria.

Uma nova tentativa foi realizada após uma nova purificação da amostra de LL-37 que estava sendo utilizada. Nessa ocasião experimental foram testados outros dois peptídeos (melitina e Kr12a5) bem como foi incluída uma cepa bacteriana (*Streptococcus mutans*, UA159 ATCC 700610), com finalidade de ampliar o entendimento do efeito do LL-37. Todos foram ressuspensos em solução salina estéril e para os 3 peptídeos foram selecionadas apenas duas concentrações, 512 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados (Figura 9) mostraram que tanto o peptídeo Kr12a5 quanto a melitina tiveram efeito antimicrobiano nas duas cepas, diferente do LL-37, que não apresentou ação.

Figura 9 - Valores médios (n=2) e desvio-padrão dos valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) obtidos para a cepa susceptível de *C.albicans* (CaS 90028) e cepa de *S. mutans* após os tratamentos experimentais



* LL-37 (512) e LL-37 (256): referem-se às concentrações de 512 µg/mL e 256 µg/mL do peptídeo LL-37.

** K (512) e K (256): referem-se às concentrações de 512 µg/mL e 256 µg/mL do peptídeo Kr12a5.

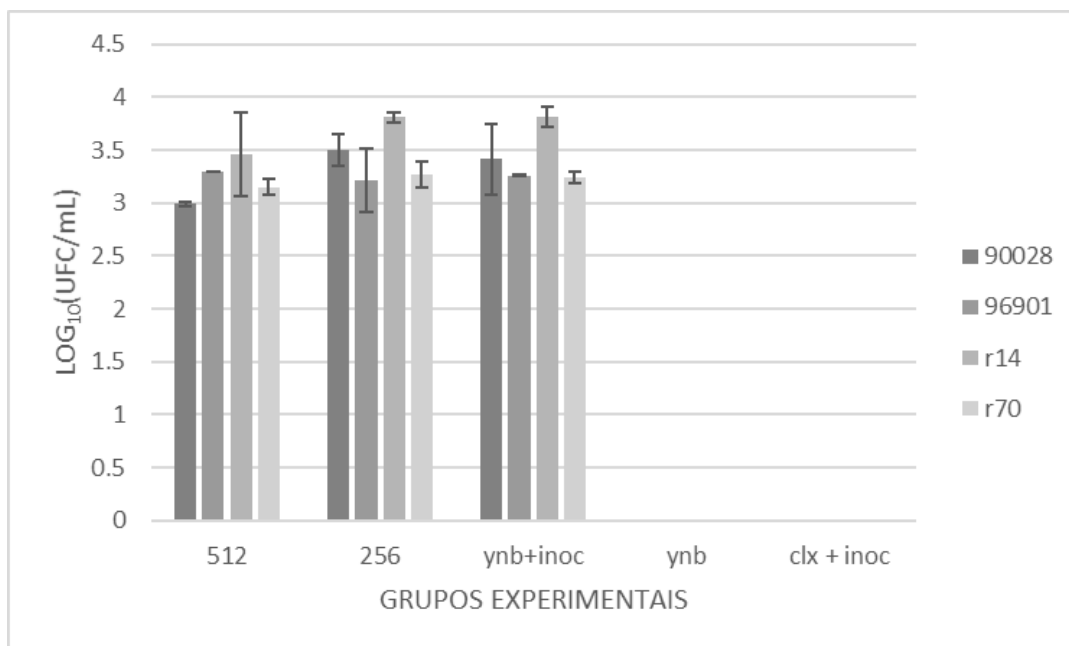
*** M (512) e M (256): referem-se às concentrações de 512 µg/mL e 256 µg/mL do peptídeo melitina.

**** SSE + Inoc: controle negativo: amostras com solução microbiana expostas à solução salina.

Fonte: Elaboração própria.

Diante disso, uma nova síntese do peptídeo LL-37 bruto foi realizada, para que assim fosse possível realizar uma última tentativa, dessa vez com todas as cepas de *C. albicans*. Novamente, os testes mostraram que o LL-37 não possuiu efeito (Figura 10). A partir desses resultados, o peptídeo LL-37 foi substituído pela melitina.

Figura 10 - Valores médios (n=2) e desvio-padrão dos valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) obtidos para as quatro cepas de *C.albicans* após os tratamentos experimentais com o peptídeo LL-37



* 512 e 256: referem-se às concentrações do peptídeo LL-37 em $\mu\text{g/mL}$.

** YNB + inoc (controle negativo): amostras microbianas expostas ao meio de cultura YNBg.

*** YNB: controle de esterilidade apenas com meio de cultura YNBg.

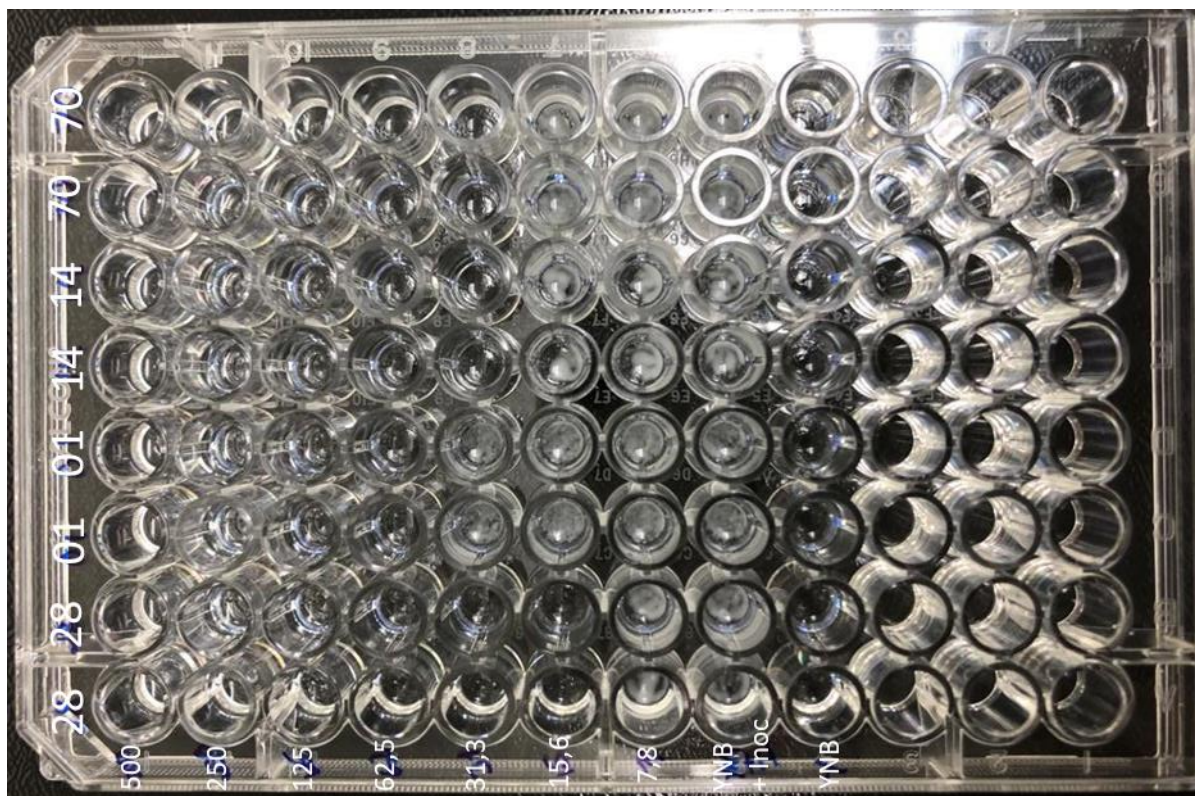
**** CLX+ inoc (controle positivo): amostras microbianas expostas à solução de clorexidina 0,12%.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2.2 Resultados utilizando o peptídeo melitina

Para a determinação da CIM/CFM do peptídeo melitina foram utilizadas sete concentrações, de $500\mu\text{g/mL}$ à $7,8\mu\text{g/mL}$. Para executar a investigação da CIM, foi realizada a análise de turvação dos poços a olho nu onde: em 4 das 5 ocasiões para a cepa CaS a CIM foi a concentração de $16\mu\text{g/mL}$. Para a cepa CaR, em 4 das 5 ocasiões a CIM foi a concentração de $62\mu\text{g/mL}$. E por fim, para os isolados clínicos R14 e R70, em 4 das 5 ocasiões a CIM foi a concentração de $31\mu\text{g/mL}$. Em todas as ocasiões houve turvação nas amostras de controle negativo (YNBg + inóculo) (Figura 11).

Figura 11 - Placa de 96 poços contendo amostras de quatro cepas de *C.albicans* obtida para avaliação da CIM/CFM do peptídeo melitina



* 28, 01, 14 e 70: referem-se às cepas CaS 90028, CaR 96901, R14 e R70, respectivamente.

**500 à 7,8: referem-se às concentrações do peptídeo (de 500µg/mL à 7,8 µg/mL).

*** YNB+Inoc: controle negativo: amostras contendo meio de cultura YNBg e inóculo microbiano.

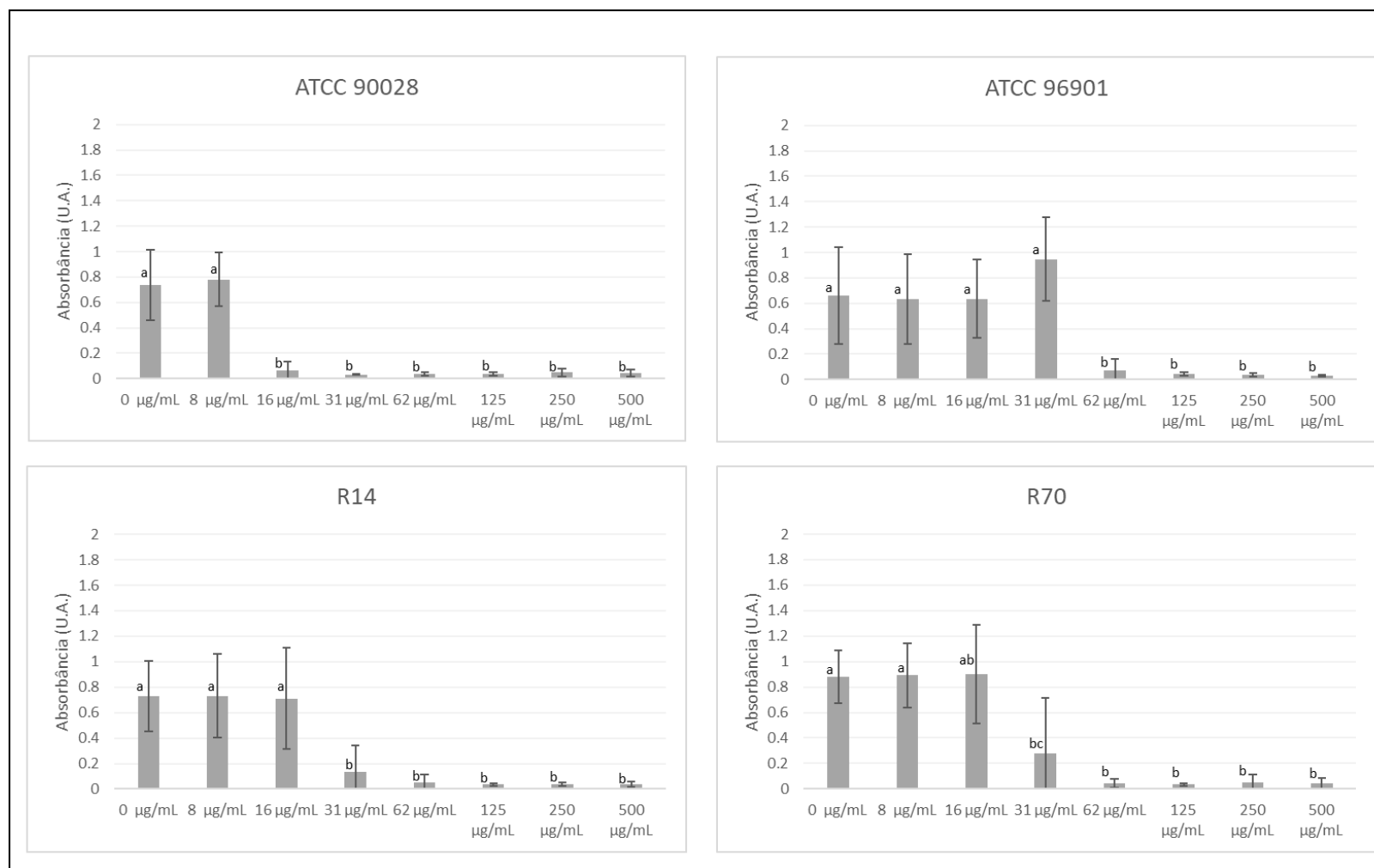
**** Y: controle de esterilidade: amostras contendo meio de cultura YNBg.

Fonte: Elaboração própria.

Além da inspeção visual a olho nu, as amostras também tiveram as absorvâncias aferidas para que fosse possível obtenção de dados quantitativos a respeito da CIM. Como resultado, para todas as cepas observou-se diferença estatisticamente significativa (ANOVA; $p < 0,0001$), portanto a concentração de melitina teve efeito estatisticamente significativo na atividade antimicrobiana. A Figura 12 mostra o resultado das comparações múltiplas com o qual se confirmou o resultado observado visualmente pela turvação dos poços.

As amostras também foram plaqueadas para possibilitar estimação dos valores de UFC/mL e a CFM. A CFM foi de 62, 250, 500 e 500µg/mL para as cepas CaS, CaR, R14 e R70 respectivamente. Adicionalmente, para todas as cepas, observou-se efeito significativo de concentrações menores que as CFM de melitina (ANOVA; $p < 0,0001$) e os resultados das comparações múltiplas entre médias para cada cepa estão apresentados na Figura 13.

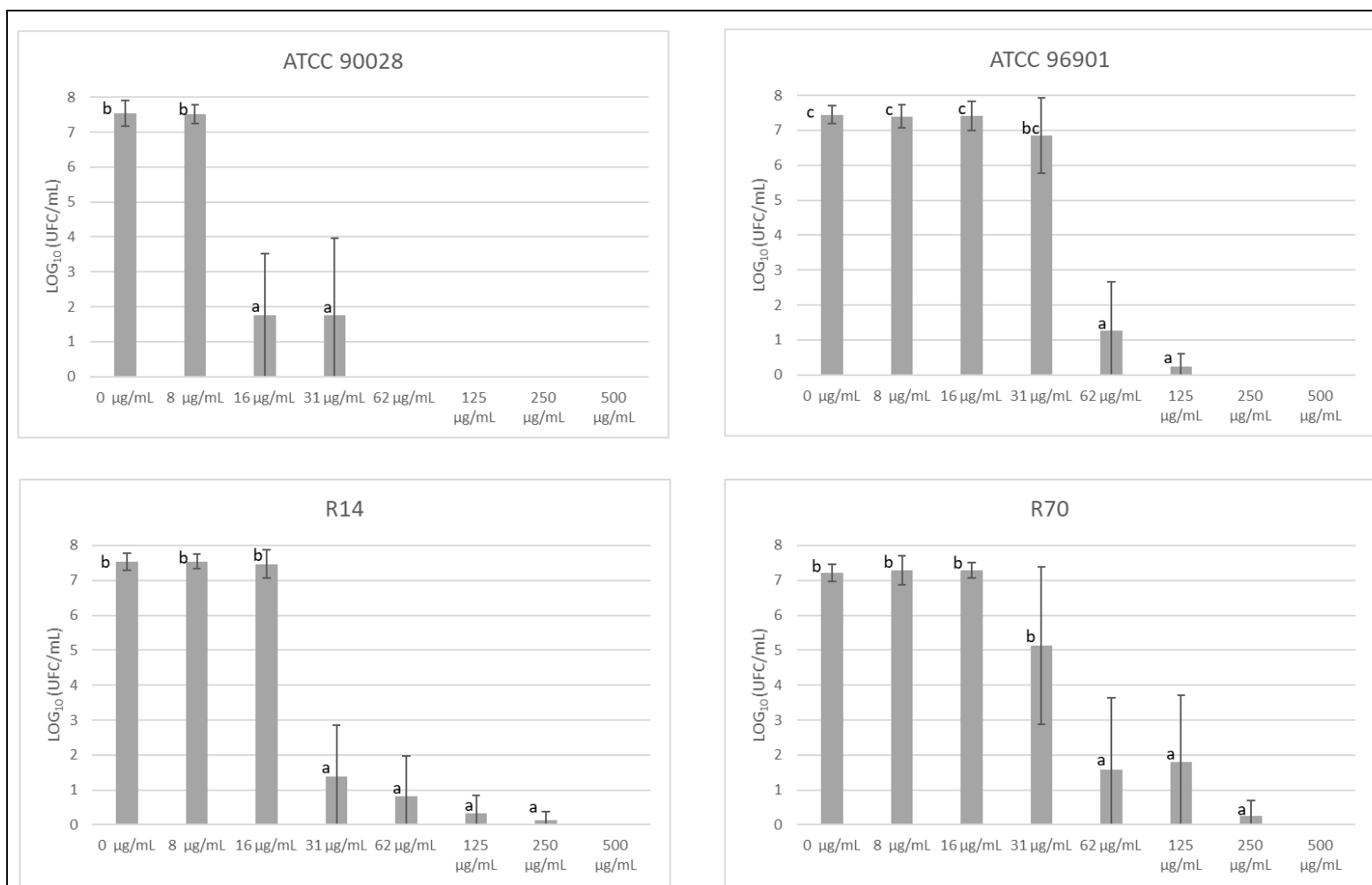
Figura 12 - Valores médios e desvio padrão dos valores de absorbância aferidos nas amostras das quatro cepas de *Candida* (ATCC 90028, ATCC 96901, R14 e R70) após o teste de concentração inibitória mínima (CIM) da melitina



Diferentes letras denotam médias com diferenças estatisticamente significativas de acordo com o pós-teste Games Howell ($p \leq 0,026$)

Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 - Valores médios e desvio padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ aferidos nas amostras das quatro cepas de *Candida* (ATCC 90028, ATCC 96901, R14 e R70) após o teste de concentração fungicida mínima (CFM) da melitina



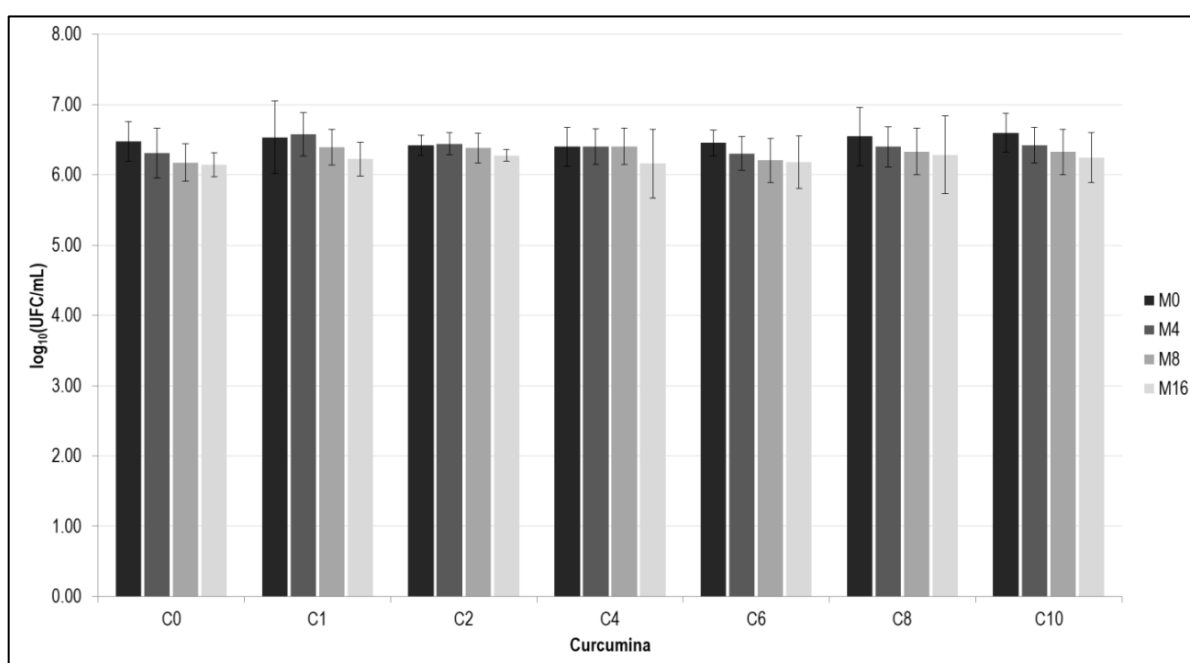
Diferentes letras denotam médias com diferenças estatisticamente significativas de acordo com o pós-teste Games Howell ($p < 0,0001$)

Fonte: Elaboração própria.

5.2.3 Avaliação do efeito fotodinâmico sobre culturas planctônicas

Para a susceptível ao fluconazol na condição sem luz (Figura 14), a curcumina não possuiu efeito sobre a viabilidade do microrganismo, mas observou-se pequena redução nos valores de log quando as amostras foram expostas à melitina. Especificamente, a redução observada com as concentrações de 8µg/mL e 16µg/mL foram estatisticamente significativas em comparação com o controle (M0; $p \leq 0,023$) e equivalentes entre si (M8xM16 $p=0,184$). A redução ocorreu independente do fator curcumina, tendo sido observada em todas as condições de maneira semelhante e atingiu a redução máxima de 0,27 log.

Figura 14 – Valores médios e desvio padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos nas condições experimentais sem luz (CPDI) da associação de curcumina e melitina sobre as amostras planctônicas de *C. albicans* (CaS 90028)



C0 à C10 referem-se às concentrações de curcumina: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10µM.

M0 à M16 referem-se às concentrações de melitina: 0, 4, 8 e 16 µg/mL.

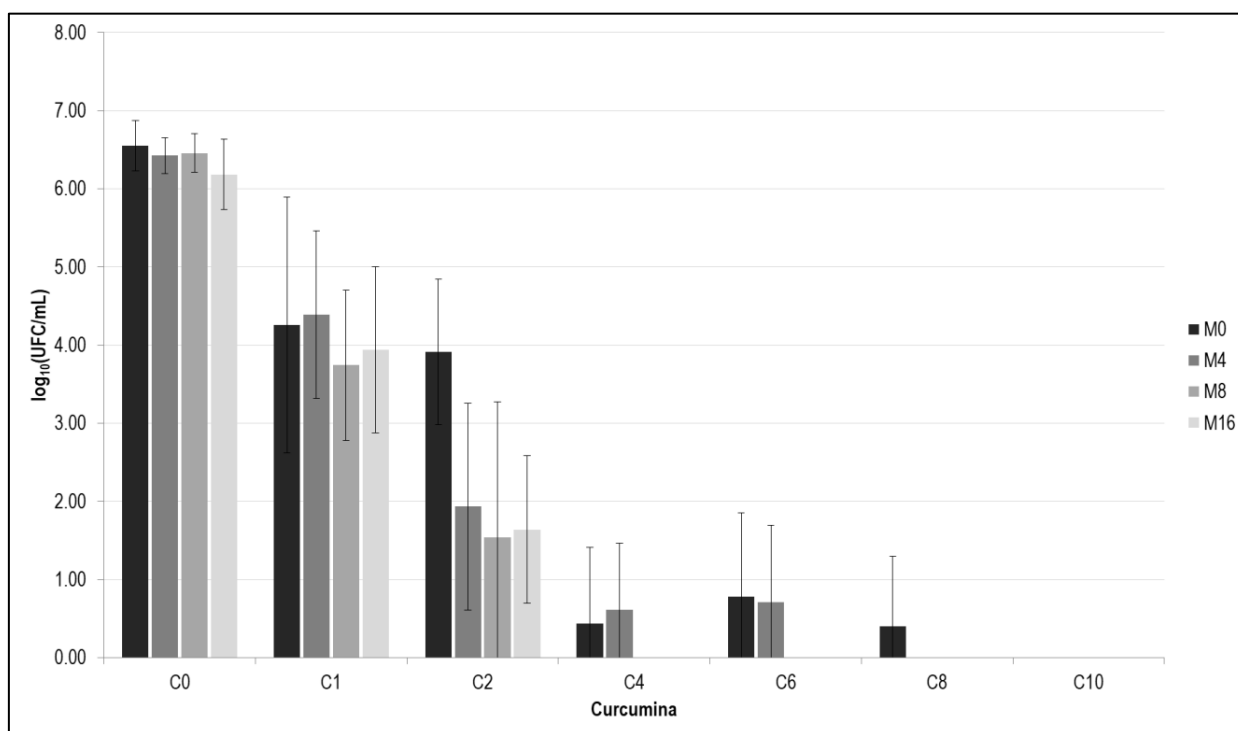
Resultado da ANOVA dois fatores: Curcumina ($p=0,650$), Melitina ($p=0,003$), Curcumina x Melitina ($p=1,000$).

Fonte: Elaboração própria.

Quando associada à iluminação, tanto a curcumina como a melitina promoveram redução nos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$, embora a interação entre ambas não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 15). De forma geral, todas as concentrações de curcumina (a partir da 1µM) foram capazes de promover redução significativa na viabilidade do microrganismo em comparação ao controle (C0_M0; $p \leq 0,0001$). As concentrações de 1µM

e 2 μM mostraram diferença entre si ($p < 0,0001$) enquanto que entre C4, C8 e C10 a diferença observada não foi considerada estatisticamente significativa ($p = 1,000$). Com relação ao efeito da melitina, a utilização de M8 e M16 promoveu redução significativa em relação ao controle (C0_M0; $p \leq 0,004$), e entre M8 e M16 não foi identificada diferença ($p = 0,498$).

Figura 15 - Valores médios e desvio padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos nas condições experimentais após iluminação LED (PDI) da associação de curcumina e melitina sobre as amostras planctônicas de *C. albicans* (CaS 90028)



C0 à C10 referem-se às concentrações de curcumina: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 μM .

M0 à M16 referem-se às concentrações de melitina: 0, 4, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$.

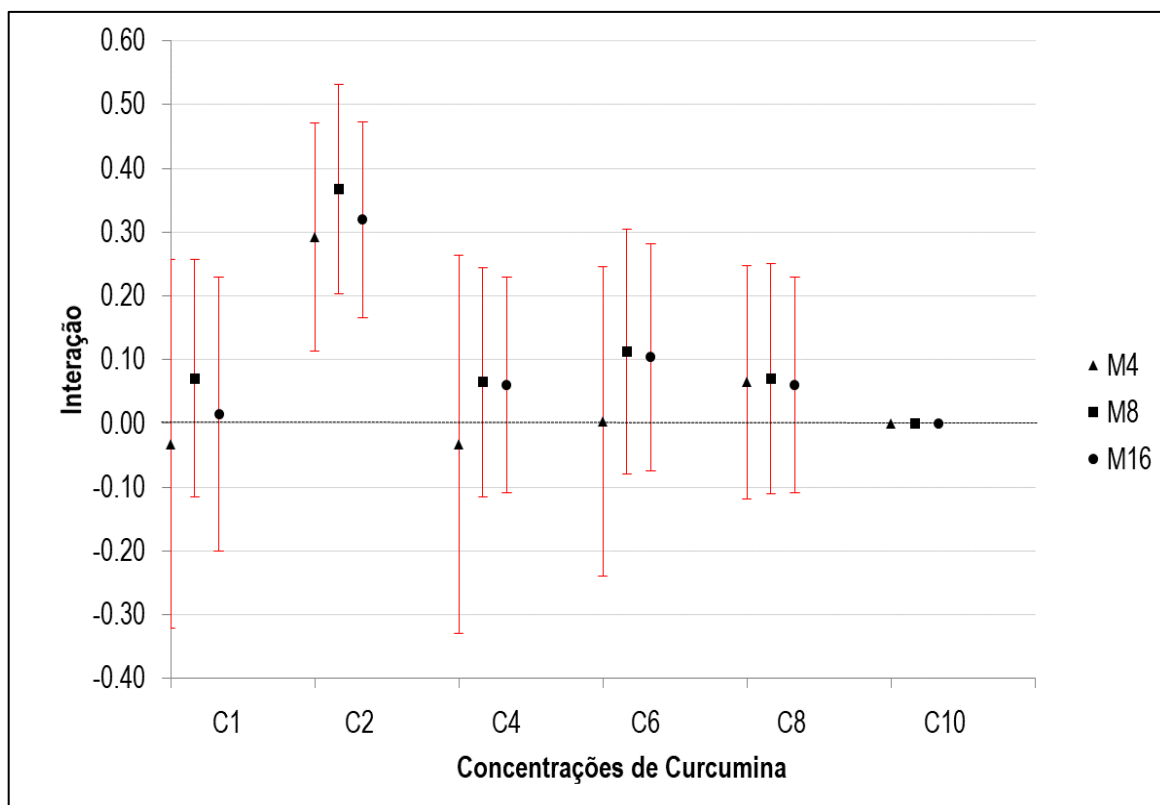
Resultado da ANOVA dois fatores: Curcumina ($p < 0,0001$), Melitina ($p = 0,001$), Curcumina x Melitina ($p = 0,180$).

Fonte: Elaboração própria.

Embora a ANOVA não tenha apontado interação entre curcumina e melitina significativa, a análise de independência de Bliss identificou a presença de sinergismo entre ambas substâncias nas condições C2, nas quais a presença de melitina, independente da concentração, intensificou o efeito fotodinâmico apresentado pela curcumina sozinha (Figura 16). Também é importante destacar que em algumas condições experimentais específicas de cruzamento entre curcumina e melitina não foi identificado crescimento fúngico como no

cruzamento da C4 e C8 com M8 e M16, e C8 com M4, M8 e M16. A utilização de C10 resultou em ausência de crescimento independentemente da presença ou ausência da melitina.

Figura 16 - Gráfico do efeito de interação obtido a partir da análise de independência de Bliss da combinação de curcumina com melitina para a cepa *C.albicans* (CaS 90028)



C0 à C10 referem-se às concentrações de curcumina: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 μM .
M0 à M16 referem-se às concentrações de melitina: 0, 4, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaboração própria.

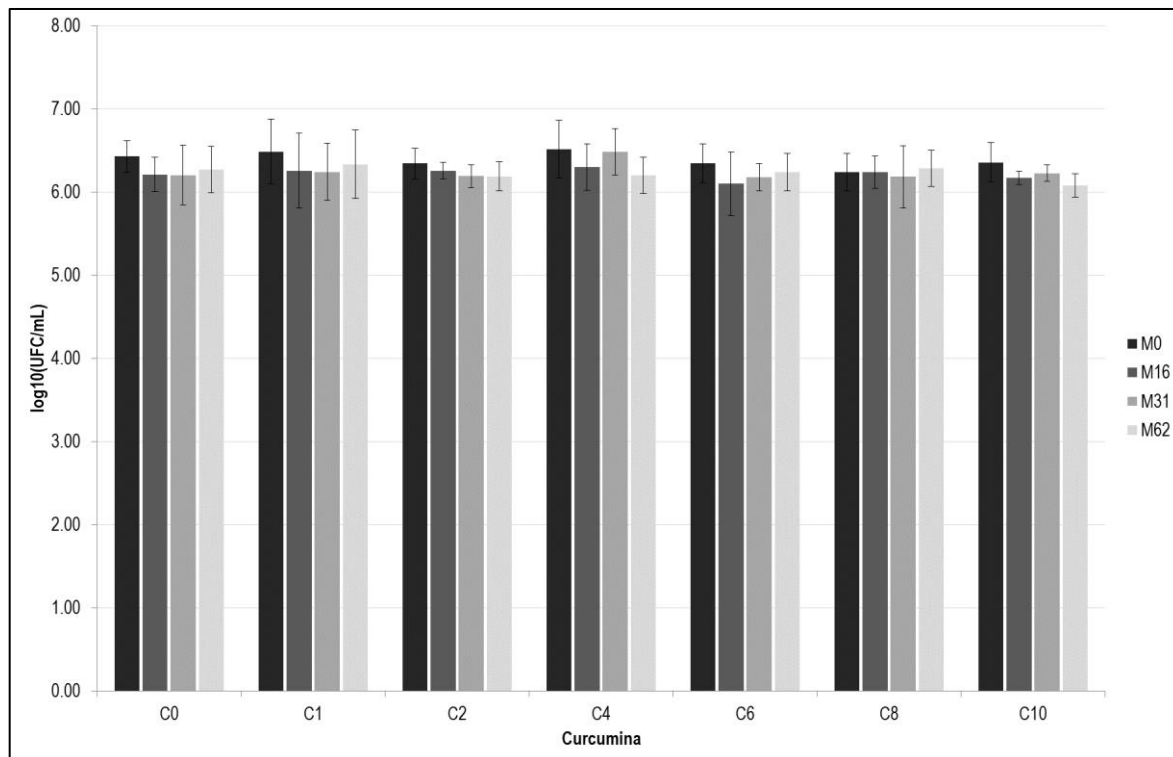
Para a cepa CaR, resistente ao fluconazol, o resultado da ANOVA a dois fatores evidenciou efeito não significativo da curcumina, da melitina e da interação entre eles, sobre a viabilidade deste microrganismo nas condições sem iluminação ($p > 0,711$) (Figura 17).

Após a iluminação (PDI), houve redução nos valores $\log_{10}\text{UFC/mL}$, promovida tanto pela curcumina quanto pela melitina, embora a interação entre ambas não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 18).

A curcumina nas condições C1 e C4 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle C0 apesar da concentração 4 μM apresentar um valor próximo ao limite de significância ($p = 0,054$). As condições C2, C6, C8 e C10 de curcumina foram estatisticamente diferentes do controle, ou seja, promoveram redução significativa na viabilidade do microrganismo ($p < 0,0001$). Dentre elas, apenas as concentrações 2 μM e 6 μM

apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p=0,34$). Em relação a melitina, todas as concentrações 16, 31 e 62 $\mu\text{g/mL}$ foram estatisticamente iguais entre si ($p>0,346$) e apenas a concentração 62 $\mu\text{g/mL}$ foi diferente do controle ($p=0,16$)

Figura 17 - Valores médios e desvio padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos nas condições experimentais sem luz (CPDI) da associação de curcumina e melitina sobre as amostras planctônicas de *C. albicans* (CaR 96901)



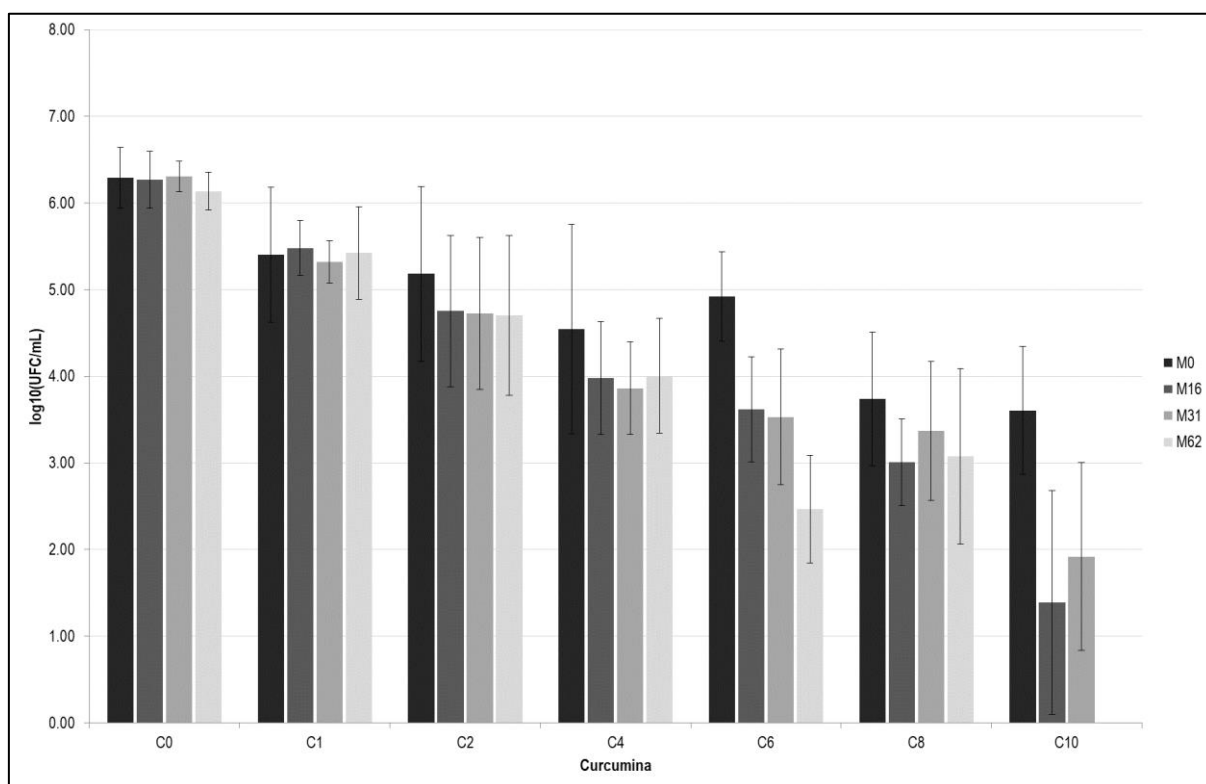
C0 à C10 referem-se às concentrações de curcumina: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 μM .

M0 à M16 referem-se às concentrações de melitina: 0, 4, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$

ANOVA dois fatores: Curcumina ($p=0,719$), Melitina ($p=0,936$), Curcumina x Melitina ($p=0,711$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 18 - Valores médios e desvio padrão dos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos nas condições experimentais após iluminação LED (PDI) da associação de curcumina e melitina sobre as amostras planctônicas de *C. albicans* (CaR 96901)



C0 à C10 referem-se às concentrações de curcumina: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 μM .

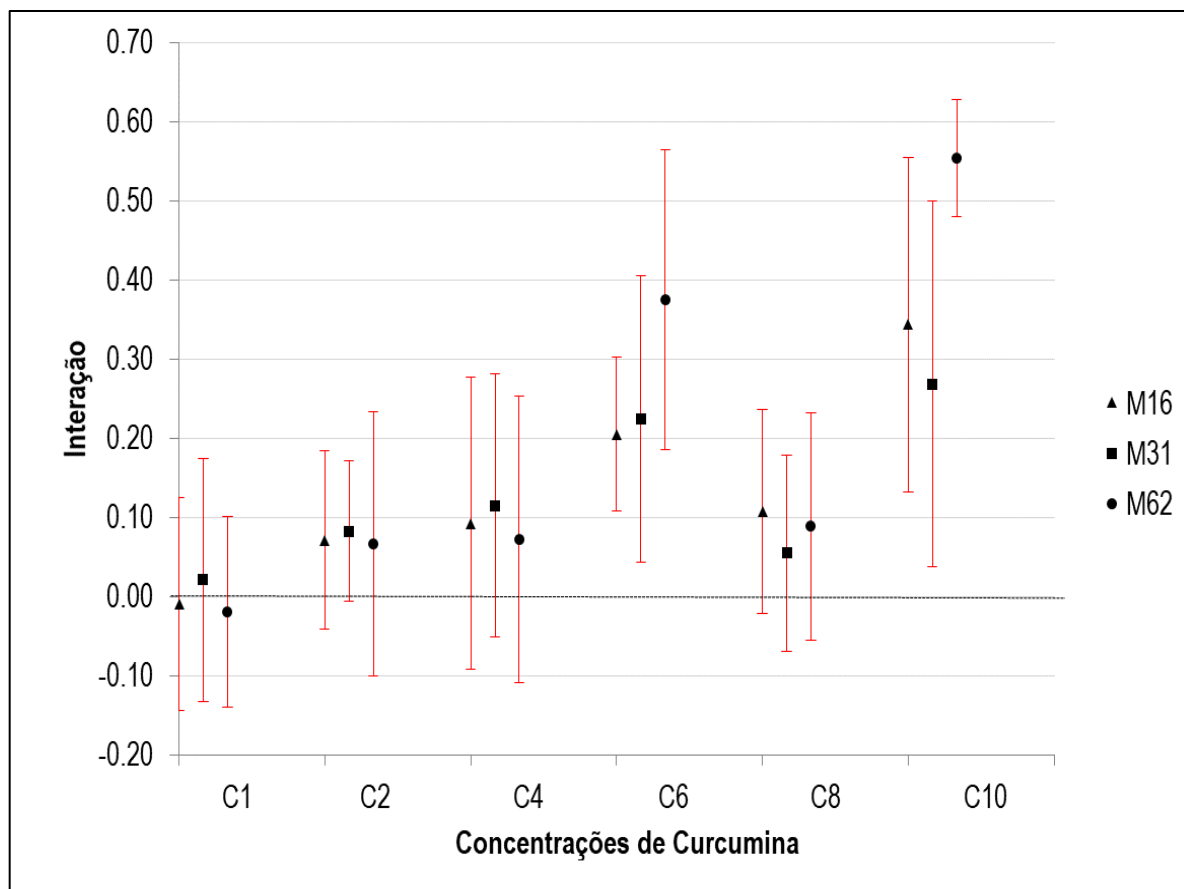
M0 à M16 referem-se às concentrações de melitina: 0, 4, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$

ANOVA dois fatores: Curcumina ($p < 0,0001$), Melitina ($p = 0,25$), Curcumina x Melitina ($p = 0,946$).

Fonte: Elaboração própria.

De maneira semelhante ao observado para a cepa CaS, embora a ANOVA não tenha identificado efeito significativo da interação entre curcumina e melitina, a análise de independência de Bliss identificou a presença de sinergismo entre as moléculas em algumas condições (Figura 19). Especificamente, para a cepa CaR, o sinergismo foi identificado nas condições de curcumina C6 e C10.

Figura 19 - Gráfico de interação obtido a partir da análise de independência de Bliss da combinação de curcumina com melitina para a cepa *C. albicans* (CaR 96901)



C0 à C10 referem-se às concentrações de curcumina: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 μ M.
M0 à M16 referem-se às concentrações de melitina: 0, 4, 8 e 16 μ g/mL.

Fonte: Elaboração própria.

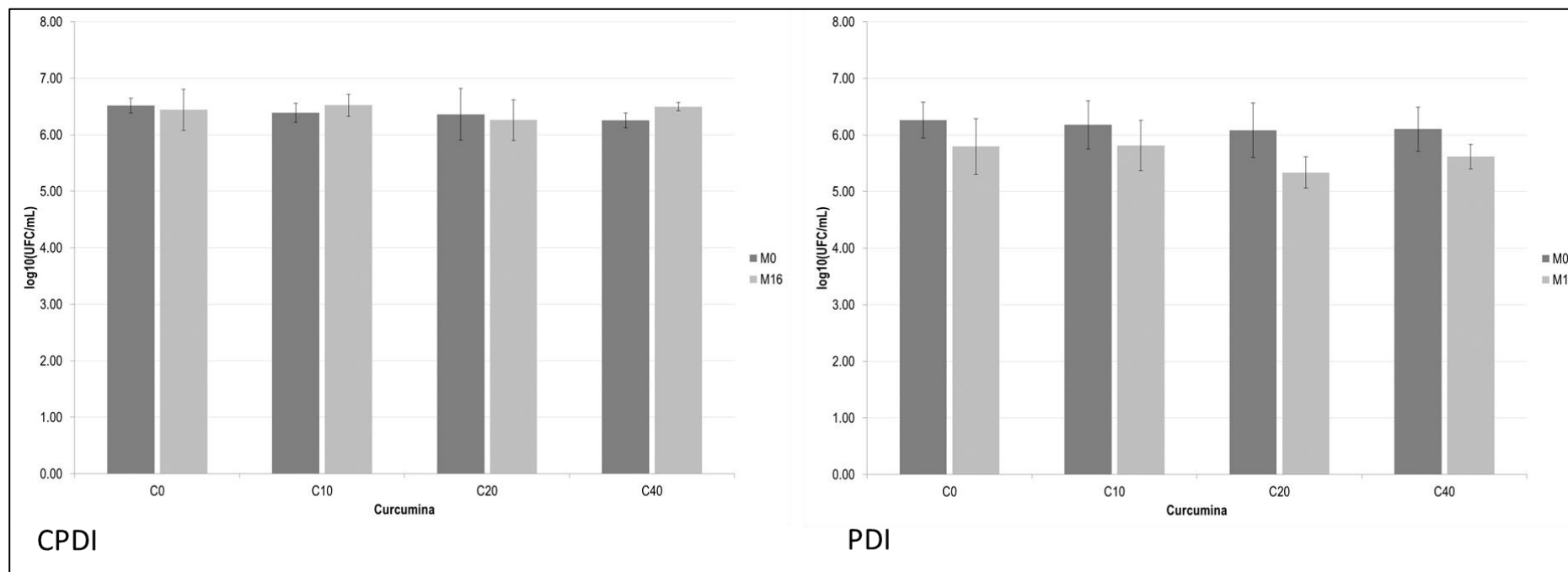
5.2.4 Análise do efeito antimicrobiano sobre biofilmes

Para ambas as cepas, a utilização da curcumina associada ou não à melitina sem iluminação não levou a efeito significativo nas contagens de colônias viáveis após os tratamentos (Tabelas C5 e C6 para CaS e CaR, respectivamente). Esse resultado pode ser visualizado nas Figuras 20 e 21.

Após aplicação de luz, a cepa CaS apresentou significância estatística apenas para a melitina ($p < 0,0001$) mostrando que o peptídeo teve influência na viabilidade do biofilme. A curcumina sozinha e na interação com o peptídeo não demonstraram efeito significativo ($p > 0,267$). Já para a cepa CaR, a melitina não apresentou diferença, porém apresentou o valor de $p = 0,075$, próximo ao limite de significância. A curcumina sozinha e a interação novamente não apresentaram diferenças significantes. Em ambas as cepas, a maior redução

de viabilidade ocorreu na concentração de 20 μ M da curcumina associada a MIC do peptídeo (redução de 0,93 log para CaS e 0,68 log para CaR).

Figura 20 - Valores médios e desvio padrão obtidos em cada condição experimental obtida pelo cruzamento de 4 concentrações de curcumina (C0 à C40: 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 40 μ M) e melitina (M0 e M16: 0 μ g/mL e 16 μ g/mL) após testes em biofilme com a cepa *C. albicans* (CaS 90028)

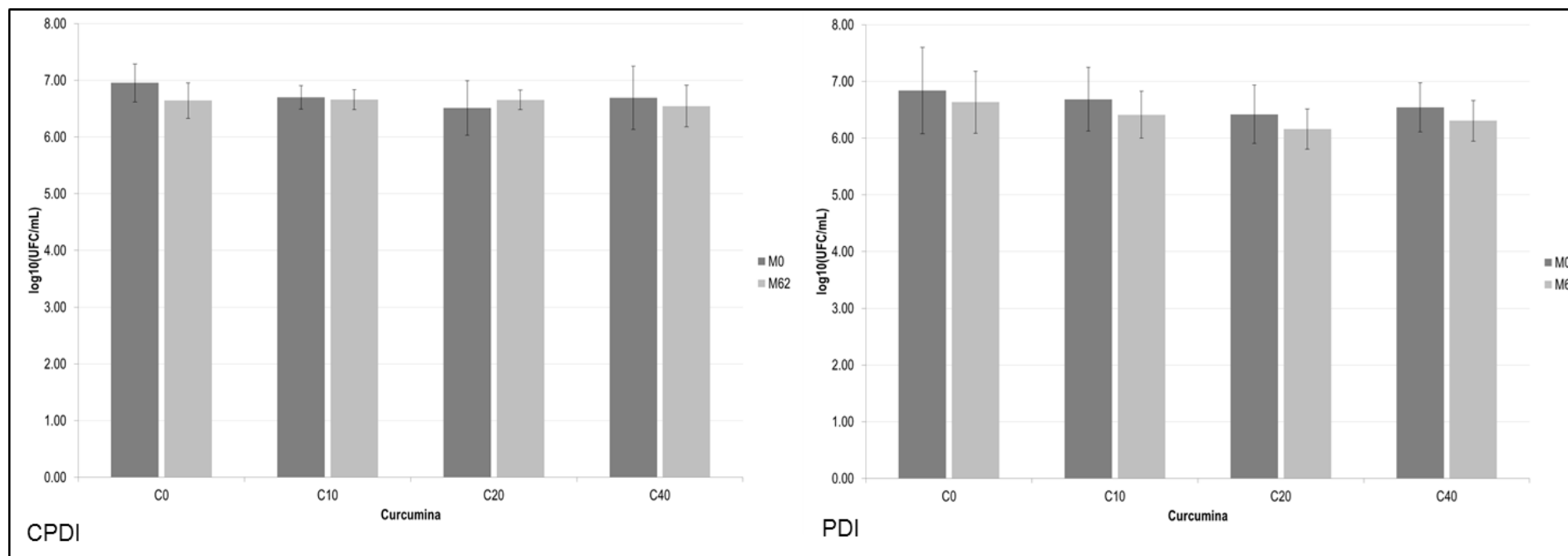


CPDI: controle (amostras não iliminadas); PDI: amostras expostas à iluminação.

ANOVA a dois fatores CPDI: $p \geq 0,426$; ANOVA a dois fatores PDI: curcumina ($p = 0,267$), melitina ($p < 0,0001$), curcumina x melitina ($p = 0,730$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 21 - Valores médios e desvio padrão obtidos em cada condição experimental obtida pelo cruzamento de 4 concentrações de curcumina (C0 à C40: 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M e 40 μ M) e melitina (M0 e M62: 0 μ g/mL e 62 μ g/mL) após testes em biofilme com a cepa *C. albicans* (CaR 96901)



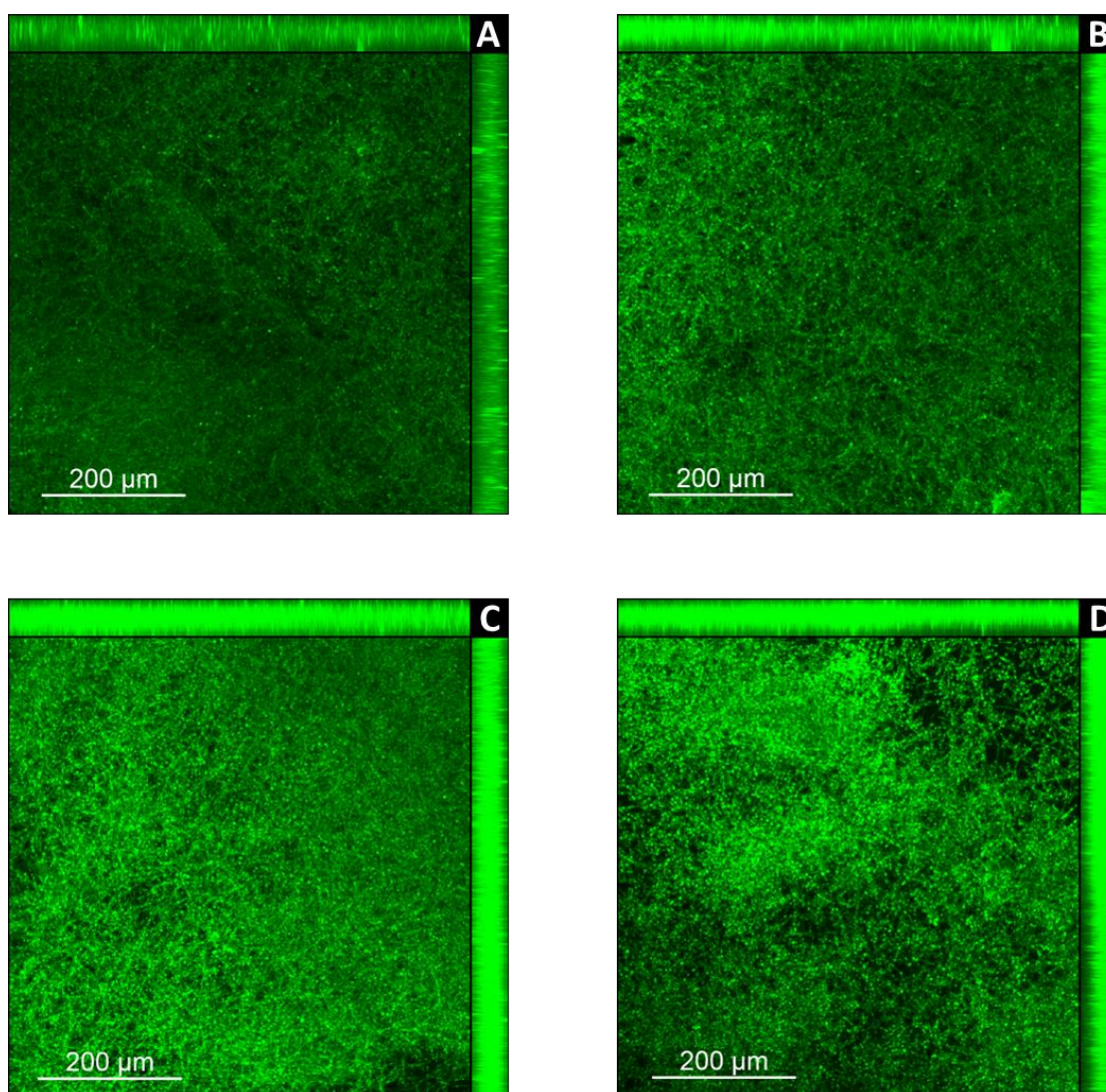
CPDI: controle (amostras não iliminadas); PDI: amostras expostas à iluminação.

ANOVA a dois fatores CPDI: $p \geq 0,433$; ANOVA a dois fatores PDI: $p \geq 0,075$.

Fonte: Elaboração própria.

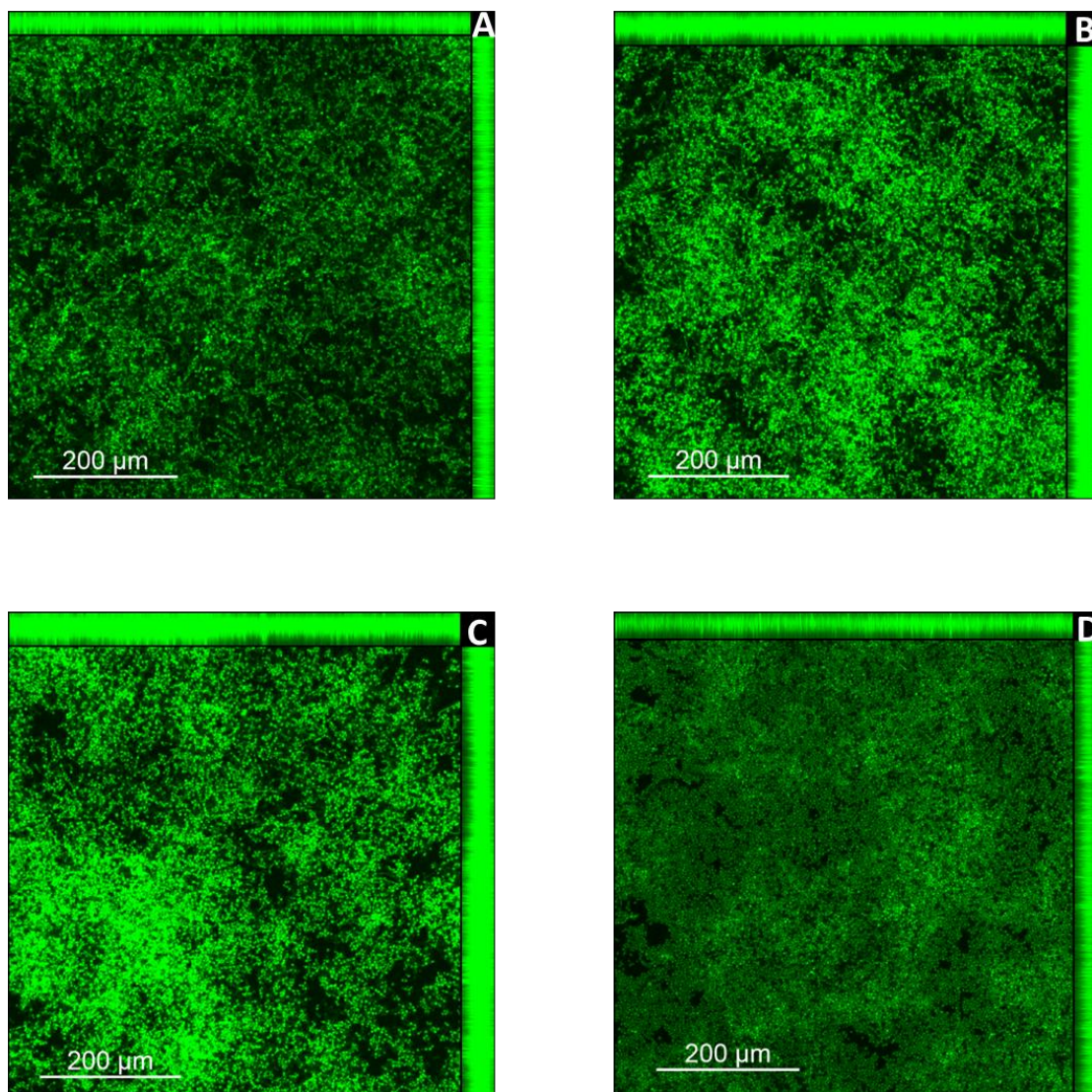
Finalmente, por meio das leituras no Microscópio de Fluorescência Confocal, pode-se observar um aumento da fluorescência das células de *C. abicans* tanto da cepa CaS quanto para a CaR em função do tempo de contato com o peptídeo melitina+curcumina. Foi possível avaliar que quanto maior o tempo de exposição do biofilme, maior quantidade de curcumina conseguiu adentrar as células microbianas (Figura 22 e 23). Entretanto, não houve grandes diferenças de Z Stack para cada amostra.

Figura 22 - Imagens de fluorescência confocal de biofilmes da cepa CaS 90028 expostos a diferentes tempos em contato com o peptídeo melitina (A: 5 minutos; B: 15 minutos; C: 30 minutos e D: 24 horas



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Figura 23 - Imagens de fluorescência confocal de biofilmes da cepa CaR 96901 expostos a diferentes tempos em contato com o peptídeo melitina (A: 5 minutos; B: 15 minutos; C: 30 minutos e D: 24 horas



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

6 DISCUSSÃO

Com o intuito de ultrapassar as dificuldades encontradas em torno da resistência antifúngica, novos tratamentos (alternativos ou complementares) necessitam ser desenvolvidos. Além disso, terapias que sejam improváveis de causar novas formas de resistência nos microrganismos são de extrema importância. Dentro deste contexto, a presente investigação buscou avaliar a eficácia antimicrobiana de dois tratamentos alternativos em conjunto, a PDI em associação com PAMs.

O primeiro relato de pesquisa acerca desta abordagem de associação data de meados do ano 2000⁴² no qual o peptídeo Polilisina foi conjugado a um isômero de porfirina para avaliação do efeito antimicrobiano contra cepas de *E.coli*, *S. aureus* resistente à metilicina, *C. albicans* e micoplasmas. Desde então, muitos outros estudos vêm surgindo sendo que, até o ano de 2022, 39 artigos que tratam da avaliação do efeito dessa associação foram identificados. Destes, quatro buscaram examinar o efeito antimicrobiano das duas terapias sem que houvesse nenhum tipo de união química entre FS e PAM, apenas quando o FS estava na presença do peptídeo^{47,48,67,76}. Na etapa laboratorial da presente pesquisa, esta forma de associação das terapias (sem união química) foi abordada.

A princípio, este estudo previa a utilização do peptídeo LL-37 em associação com a curcumina para avaliação do efeito antimicrobiano. Entretanto, os resultados iniciais não evidenciaram efeito antimicrobiano do LL-37 nas cepas investigadas. Na literatura foram encontrados relatos mostrando o potencial antifúngico e até mesmo antibiofilme resultante da atividade do LL-37, o que não corrobora com nossos achados^{129,130}. Por essa razão, foram realizadas algumas alterações no protocolo metodológico previsto inicialmente. Já é sabido que os peptídeos antimicrobianos podem ter seu efeito reduzido ou até mesmo inibido quando na presença de alguns sais¹⁵⁵. Como o meio de cultura YNBg possui sais em sua composição, foi realizada a troca da forma de ressuspensão do LL-37, de YNBg para salina, e posteriormente para água ultrapura estéril. Mesmo assim, nenhum resultado foi percebido.

Afim de dar seguimento a pesquisa, o peptídeo LL-37 foi substituído pela melitina. Como resultado do efeito anti *candida* deste PAM, foi obtido que a CIM da cepa suscetível ao fluconazol CaS foi de 16µg/mL, para a cepa de resistente ao fluconazol CaR a CIM foi de 62 µg/mL e para ambos os isolados clínicos com resistência ao fluconazol foi de 31 µg/mL. Dessa forma, é possível avaliar que os valores de CIM variam de acordo com a cepa utilizada. Na literatura, apenas para a cepa CaS foram identificados estudos de CIM afim de comparação^{137,156-158}. O maior valor observado foi 100µg/mL em Al-ani et al.¹³⁷ provavelmente por conta de diferenças metodológicas observadas, já que neste trabalho, a concentração das células utilizadas foi de 1×10^5 com o período de incubação por 48 horas, enquanto que em

nosso trabalho a concentração das células foi menor e também por menor tempo de incubação.

Como um dos principais objetivos da pesquisa foi avaliar se o peptídeo poderia potencializar o efeito fotodinâmico da curcumina, o ensaio de fotodegradação foi realizado previamente aos testes microbiológicos, a fim de observar se efeitos prejudiciais poderiam ser observados no perfil de absorbância do FS. Foi verificado que a melitina não alterou o pico de absorção da curcumina, que permaneceu em torno de 430nm, além de não causar diminuição na absorbância, demonstrando que não houve prejuízo na capacidade de absorção de luz deste FS. Esse é um importante achado, uma vez que a literatura já mostrou que outros PAMs podem causar prejuízo na capacidade de absorção de luz da curcumina, como é o caso da aureína 1.2⁴⁷.

Uma vez conhecidas as CIMs da melitina para as diferentes cepas e sabendo-se que o peptídeo não possuía potencial de alterar o perfil de absorção de luz da curcumina, a associação de melitina e curcumina foi avaliada sobre células planctônicas das cepas de referência. As concentrações de melitina utilizadas foram definidas a partir da CIM como sendo CIM, $\frac{1}{2}$ CIM e $\frac{1}{4}$ CIM. Essa decisão foi tomada já que o interesse seria verificar se a melitina, em concentrações não letais, poderia intensificar o efeito fotodinâmico da curcumina. Foi possível observar que, tanto a cepa susceptível ao fluconazol quanto a cepa resistente, mostraram redução significativa nos valores de $\log_{10}$ UFC/mL após algumas condições experimentais. Entretanto, a CaR apresentou menor susceptibilidade em comparação com a CaS já que nenhum tratamento resultou na total eliminação da viabilidade das amostras fúngicas. Na literatura tal achado já vem sendo documentado, como o estudo de Mardani et al.¹⁵⁹ em 2021 no qual observou-se a menor susceptibilidade de uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol após tratamento com a PDI mediada por indocianina verde, em comparação com uma cepa padrão. Da mesma forma, Dovigo et al.¹⁶⁰ 2011, descreveram ter sido necessária uma concentração maior de Photogem® para eliminação de cepas resistentes. Em relação a susceptibilidade ao efeito de PAMs, Burrows et al.¹⁶¹ 2006 pode avaliar que não somente *C. albicans*, mas também outras espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol apresentaram valores de CIM maiores quando comparadas as cepas suscetíveis.

Quando realizada a análise de Bliss para avaliação do sinergismo entre melitina e curcumina na PDI, foi observado que em determinadas concentrações a presença do peptídeo foi capaz de intensificar o efeito fotodinâmico proporcionado pela curcumina. Tal fato pode ser explicado provavelmente pelo efeito causado pelo peptídeo na membrana citoplasmática da célula de *C. albicans*. Park et al.¹⁶² demonstrou que após a exposição de células de *C. albicans* à melitina por 2 horas, houve um aumento na intensidade de fluorescência promovido pelo corante SYTOX Green, este que só é capaz de adentrar as células quando poros são formados. Provavelmente este efeito é capaz de auxiliar na compreensão do sinergismo, uma

vez que o peptídeo é capaz de criar vias de entrada na célula facilitadas para a curcumina. O efeito de formação de poros e causador de danos na membrana por parte da melitina é consolidado na literatura. Vários são os estudos a respeito deste tema, destacando seu efeito perturbador da membrana independente de variáveis como temperatura e sal, com a formação de poros de até 4,8nm^{135,163}. Além disso, um outro fator que pode ter contribuído para o sinergismo entre as moléculas é a geração de EROs. Assim como a PDI possui seu principal mecanismo de morte celular a partir da geração de espécies reativas de oxigênio, a melitina também é capaz de produzir EROs. Parke e Lee¹⁶⁴ em 2010 demonstraram os níveis aumentados de EROs nas células após a aplicação da melitina a partir de análises de citometria de fluxo. Este fato torna-se uma abordagem promissora para estudos futuros a fim de quantificar o quanto as duas moléculas em associação podem contribuir para a formação de espécies reativas, assim como abre possibilidades para maiores análises a respeito do peptídeo em contato com a luz. Em 2021, Ventura et al.¹⁶⁵ descreveu a alteração de um dos aminoácidos da melitina por um derivado sintético do aminoácido azobenzeno, criando assim a fotomelitina. Este derivado mostrou um aumento na atividade de 1,5 vezes após exposição a luz U.V. em comparação a luz visível.

A respeito da cepa CaR foi observado que o sinergismo entre as moléculas aconteceu na concentração de 10µM e 6µM de curcumina. Já para a cepa CaS o sinergismo não apareceu em concentrações mais altas do FS, apenas na concentração de 2µM. Isso mostra que o peptídeo em concentrações de CIM e sub-CIM pode ser importante para que a curcumina seja utilizada em concentrações menores, dessa forma as duas moléculas em concentrações mais baixas são capazes de auxiliar no efeito uma da outra. O uso da curcumina em concentrações menores é desejado, já que este FS possui extrema dificuldade de solubilização. Além da melitina, que por originar-se do veneno de uma abelha, concentrações menores são extremamente almejadas afim de não se obter efeitos citotóxicos¹⁶⁶.

É importante salientar que a avaliação das duas terapias em conjunto sem aplicação de luz foi realizada com o intuito de verificar se a curcumina e a melitina no escuro poderiam apresentar algum efeito de morte contra as células planctônicas de *C. albicans*. Foi visto que não houve redução nos valores de log₁₀UFC/mL mostrando que de fato o efeito antimicrobiano verificado é resultado fotodinâmico.

De acordo com a literatura, o uso de peptídeos antimicrobianos contra biofilmes também parece ser promissor. A baixa taxa de seleção de mutantes resistentes e a cinética de rápida ação dos PAMs, em comparação com os antifúngicos convencionais, podem ser um recurso adequado contra comunidades microbianas dinâmicas como é o caso dos biofilmes³⁰. Para tanto, foi explorada a atividade antimicrobiana dos tratamentos associados contra biofilmes de *C. albicans*. Não foi observado efeito antimicrobiano como resultado da PDI associando a

melitina e curcumina para as duas cepas investigadas. Tal fato não está de acordo com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, haja visto que foi observado efeito anti-biofilme da curcumina após iluminação LED¹⁵⁹ entretanto, nos estudos passados foi utilizada a curcumina natural, e neste caso a utilizada foi a sintética. Outro fato interessante observado a respeito dos biofilmes é que para a cepa CaS, apenas a atuação da melitina apresentou significância estatística ($p \leq 0,05$) após aplicação de luz e para a cepa CaR, o valor de p chegou muito próximo ao limiar de significância ($p = 0,075$). Estes resultados mostram que a melitina parece ter uma tendência de apresentar efeito sobre os biofilmes quando associada a PDI devido ao fato de que na análise descritiva dos dados, foi possível observar uma redução na viabilidade celular onde a melitina está presente. O fato da análise estatística não ter captado uma diferença estatisticamente significativa provavelmente é explicado pelo n menor utilizado para os experimentos com biofilme ($n=5$).

Na análise de microscopia confocal sobre biofilmes, pode-se observar que quanto maior o tempo de exposição da melitina+curcumina maior foi a fluorescência observada dentro das células. Portanto, acreditamos que o aumento do tempo de contato do biofilme com o peptídeo previamente a PDI pode potencializar o efeito antimicrobiano sutil que foi observado apenas com 5 minutos de incubação. Assim, abre-se margem para estudos futuros a respeito desta mudança de protocolo.

A partir desses resultados é possível analisar que a associação do peptídeo melitina com a terapia fotodinâmica mediada pela curcumina contra células fúngicas possui potencial a ser desenvolvido. Porém, as pesquisas associando esses dois tratamentos contra *Candida spp.* ainda são escassos. Apenas três pesquisas avaliaram o desfecho da associação PDI+PAM contra *C. albicans*^{42,56,75} e um deles não apresentou efeito antimicrobiano⁵⁶. Já a curcumina foi avaliada em associação com peptídeos em duas pesquisas, que quando associada a polimixina B apresentou efeito antimicrobiano,⁷⁶ e quando na presença da aureína 1.2, não⁴⁶. A respeito da melitina, este é o primeiro trabalho com a utilização desse peptídeo em associação com a PDI, o qual possui uma gama de atuações biológicas interessantes e úteis. Apesar de haver preocupações sobre a citotoxicidade da melitina, grande parte dos estudos trabalham em baixas concentrações, conjugação com proteínas e outras moléculas, formulações com lipossomas e nanopartículas, dentre outras maneiras que capazes de reduzir seus efeitos inoportunos e adequá-la para um uso seguro¹⁶⁶.

Diante do exposto, nosso trabalho apresenta um panorama abrangente sobre a utilização da associação dos tratamentos PDI e PAMs, além de dar margem para posteriores pesquisas a respeito do peptídeo melitina e o fotossensibilizador curcumina em conjunto.

7 CONCLUSÃO

Foram identificados 39 estudos publicados que avaliaram a associação de PAM + PDI, nos quais os principais microrganismos investigados foram *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os resultados dos estudos levantados apontam para o potencial de utilização da associação PAM+PDI, independentemente do tipo de FS e PAM e das cepas, apesar de que parece haver maior eficácia para bactérias gram-positivas.

A caracterização fotofísica mostrou que a associação da melitina com curcumina não interfere no comportamento óptico da curcumina.

A melitina foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas (CIM e CFM), embora a concentração eficaz tenha sido diferente para cada cepa.

Houve efeito sinérgico da melitina com a curcumina na concentração de 2 μ M para a cepa ATCC 90028 e de 6 μ M e 10 μ M para a cepa ATCC 96901.

Em células planctônicas após iluminação, a curcumina e a melitina promoveram redução nos valores de log para as duas cepas de referência. Sem iluminação apenas a melitina promoveu redução somente para a cepa ATCC 90028.

Em biofilmes, houve redução nos valores de log após iluminação apenas para a cepa ATCC 90028 promovida pela melitina.

REFERÊNCIAS*

1. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; 9(7): 327-35.
2. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014; 4(9): a019778.
3. Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020; 39(10): 1797-819.
4. Caceres DH, Forsberg K, Welsh RM, Sexton DJ, Lockhart SR, Jackson BR et al. *Candida auris*: a review of recommendations for detection and control in healthcare settings. J Fungi (Basel). 2019; 5(4): 111.
5. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans*: biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control: an update. Microb Pathog. 2018; 117: 128- 38.
6. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel Jr et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. Infect Immun. 2016; 84(10): 2724- 39.
7. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1): 133-63.
8. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002; 78(922): 455-59.
9. Hilgert JB, Giordani JM, de Souza RF, Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-analysis. J Am Geriatr Soc. 2016; 64(12): 2539-45.
10. veillancLee X, Vergara C, Lozano CP. Severity of *Candida*-associated denture stomatitis is improved in institutionalized elders who consume *Lactobacillus rhamnosus* SP1. Aust Dent J. 2019; 64(3): 229-36.
11. O'Donnell LE, Smith K, Williams C, Nile CJ, Lappin DF, Bradshaw D et al. Dentures are a reservoir for respiratory pathogens. J Prosthodont. 2016; 25(2): 99-104.
12. van der Maarel-Wierink CD, Vanobbergen JN, Bronkhorst EM, Schols JM, de Baat C. Oral health care and aspiration pneumonia in frail older people: a systematic literature review. Gerodontology. 2013; 30(1): 3-9.
13. Rajendran R, Sherry L, Deshpande A, Johnson EM, Hanson MF, Williams C et al. A prospective study of candidaemia: epidemiology, risk factors, antifungal treatment and outcome in hospitalized patients. Front Microbiol. 2016; 7: 915.

* 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. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016; 10: 1161-71.
15. Hoepelman IM, Dupont B. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. *Int J Antimicrob Agents.* 1996; 6(3): 155-59.
16. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10 Suppl 1: 1-10.
17. Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol.* 2016; 54(3): 192-201.
18. Larkin EL, Dharmiah S, Ghannoum MA. Biofilms and beyond: expanding echinocandin utility. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(suppl_1): i73-i81.
19. Shields RK, Nguyen MH, Clancy CJ. Clinical perspectives on echinocandin resistance among *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis.* 2015; 28(6): 514-22.
20. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(12): 383-39
21. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2020; 30(4): 619-35.
22. 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.
23. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwing E, Ahmad AA et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol.* 2018; 44(5): 571-89.
24. Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front Microbiol.* 2015; 6: 202.
25. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work?. *Photochem Photobiol.* 1992; 55(1): 145- 57.
26. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(2): 49-55.
27. Warriar A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 33: 102090.
28. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103(11): 1545-57.
29. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CADS, Jacomassi DP et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4): 895-903.

30. Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem.* 2011; 18(2): 256-79.
31. Mwangi J, Hao X, Lai R, Zhang ZY. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res.* 2019; 40(6): 488-505.
32. Rončević T, Puizina J, Tossi A. Antimicrobial peptides as anti-infective agents in prepost-antibiotic era?. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(22): 5713
33. Memariani H, Memariani M, Moravvej H, Shahidi-Dadras M. Melittin: a venomderived peptide with promising anti-viral properties. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 202039(1): 5-17.
34. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2017; 402: 16-31
35. van den Bogaart G, Guzmán JV, Mika JT, Poolman B. On the mechanism of pore formation by melittin. *J Biol Chem.* 2008; 283(49): 33854-7.
36. Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep.* 2009; 26(12): 1572-84
37. Kai-Larsen Y, Agerberth B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense. *Front Biosci.* 2008; 13: 3760-67
38. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(4): 451-59.
39. Dal Mas C, Rossato L, Shimizu T, Oliveira EB, Junior PIS, Meis JF et al. Effects of the natural peptide crotamine from a south american rattlesnake on *Candida auris*, an emergent multidrug antifungal resistant human pathogen. *Biomolecules.* 2019; 9(6): 205.
40. Pathirana RU, Friedman J, Norris HL, Salvatori O, McCall AD, Kay J et al. Fluconazole resistant *Candida auris* is susceptible to salivary histatin 5 killing and to intrinsic host defenses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(2): 01872-17.
41. Tan L, Bai L, Wang L, He L, Li G, Du W et al. Antifungal activity of spider venom-derived peptide lycosin-I against *Candida tropicalis*. *Microbiol Res.* 2018; 216: 120–28.
42. Polo L, Segalla A, Bertoloni G, Jori G, Schaffner K, Reddi E. Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens. *J Photochem Photobiol B.* 2000; 59(1-3): 152-8.
43. Bourré L, Giuntini F, Eggleston IM, Mosse CA, Macrobert AJ, Wilson M. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochem Photobiol Sci.* 2010; 9(12): 1613-20.
44. Cai Q, Fei Y, An HW, Zhao XX, Ma Y, Cong Y et al. Macrophage-instructed intracellular *staphylococcus aureus* killing by targeting photodynamic dimers. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018; 10(11): 9197-202.
45. Cai X, Tian J, Zhu J, Chen J, Li L, Yang C et al. Photodynamic and photothermal co-driven CO-enhanced multi-mode synergistic antibacterial

- nanoplatfrom to effectively fight against biofilm infections. *Bioeng Transl Med* 426 2021; 131919.
46. Chu JC, Chin ML, Wong CT, Hui M, Lo PC, Ng DK. One-pot synthesis of a cyclic antimicrobial peptide-conjugated phthalocyanine for synergistic chemophotodynamic killing of multidrug-resistant bacteria. *Adv Ther* 2021; 2000204.
 47. de Freitas LM, Lorenzón EN, Santos-Filho NA, Zago LHP, Uliana MP, de Oliveira KT et al. Antimicrobial photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 4212.
 48. de Freitas LM, Lorenzón EN, Cilli EM, de Oliveira KT, Fontana CR, Mang TS. Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit gram-positive bacterial biofilm formation. *Biofouling.* 2019 Aug; 35(7): 742-57.
 49. Dosselli R, Gobbo M, Bolognini E, Campestrini S, Reddi E. Porphyrin-apidaecin conjugate as a new broad spectrum antibacterial agent. *ACS Med Chem Lett.* 2010; 1(1): 35-8.
 50. Dosselli R, Tampieri C, Ruiz-González R, De Munari S, Ragàs X, Sánchez-García D et al. Synthesis, characterization, and photoinduced antibacterial activity of porphyrin-type photosensitizers conjugated to the antimicrobial peptide apidaecin 1b. *J Med Chem.* 2013; 56(3): 1052-63.
 51. Dosselli R, Ruiz-González R, Moret F, Agnolón V, Compagnin C, Mognato M et al. Synthesis, spectroscopic, and photophysical characterization and photosensitizing activity toward prokaryotic and eukaryotic cells of porphyrin-magainin and -buforin conjugates. *J Med Chem.* 2014; 57(4): 1403-15.
 52. Feese E, Gracz HS, Boyle PD, Ghiladi RA. Towards microbe-targeted photosensitizers: Synthesis, characterization and in vitro photodynamic inactivation of the tuberculosis model pathogen *M. smegmatis* by porphyrin-peptide conjugates. *J Porphyr Phthalocyanines* 23.11n12 (2019): 1414-39.
 53. Gao Y, Wang J, Hu D, Deng Y, Chen T, Jin Q, Ji J. Bacteria-targeted supramolecular photosensitizer delivery vehicles for photodynamic ablation against biofilms. *Macromol Rapid Commun.* 2019; 40(4): e1800763.
 54. Gao Q, Huang D, Deng Y, Yu W, Jin Q, Ji J et al. Chlorin e6 (Ce6)-loaded supramolecular polypeptide micelles with enhanced photodynamic therapy effect against *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioeng Transl Med* 417 2021: 129334.
 55. Han H, Gao Y, Chai M, Zhang X, Liu S, Huang Y et al. Biofilm microenvironment activated supramolecular nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bacterial keratitis. *J Control Release.* 2020; 327: 676-87.
 56. Jiang Q, E F, Tian J, Yang J, Zhang J, Cheng Y. Light-excited antibiotics for potentiating bacterial killing via reactive oxygen species generation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020; 12(14): 16150-58.
 57. Jiang Q, Yan X, Jiao D, Zhang J, Wu Y, Cheng Y. Polymyxin B-modified conjugated oligomer nanoparticle for targeted identification and enhanced photodynamic antimicrobial therapy. *Chem Commun (Camb).* 2021; 57(85): 11244-47.
 58. Johnson GA, Muthukrishnan N, Pellois JP. Photoinactivation of gram positive and gram negative bacteria with the antimicrobial peptide (KLAKLAK)(2)

- conjugated to the hydrophilic photosensitizer eosin Y. *Bioconjug Chem.* 2013; 24(1): 114-23.
59. Johnson GA, Ellis EA, Kim H, Muthukrishnan N, Snavely T, Pellois JP. Photoinduced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK)₂. *PLoS One.* 2014; 9(3): e91220.
 60. Judzewitsch PR, Corrigan N, Wong EHH, Boyer C. Photo-enhanced antimicrobial activity of polymers containing an embedded photosensitiser. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021; 60(45): 24248-56.
 61. Le Guern F¹, Sol V, Ouk C, Arnoux P, Frochot C, Ouk TS. Enhanced photobactericidal and targeting properties of a cationic porphyrin following the attachment of polymyxin B. *Bioconjug Chem.* 2017; 28(9): 2493-506.
 62. Le Guern F², Ouk TS, Ouk C, Vanderesse R, Champavier Y, Pinault E et al. Lysine analogue of polymyxin B as a significant opportunity for photodynamic antimicrobial chemotherapy. *ACS Med Chem Lett.* 2017; 9(1): 11-16.
 63. Le Guern F³, Ouk TS, Grenier K, Joly N, Lequart V, Sol V. Enhancement of photobactericidal activity of chlorin-e6-cellulose nanocrystals by covalent attachment of polymyxin B. *J Mater Chem B.* 2017; 5(33): 6953-62.
 64. Lei X, Qiu L, Lan M, Du X, Zhou S, Cui P et al. Antibacterial photodynamic peptides for staphylococcal skin infection. *Biomater Sci.* 2020; 8(23): 6695-702.
 65. Li Z, Pan W, Shi E, Bai L, Liu H, Li C et al. A multifunctional nanosystem based on bacterial cell-penetrating photosensitizer for fighting periodontitis via combining photodynamic and antibiotic therapies. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021; 7(2): 772-86.
 66. Liu F, Soh Yan Ni A, Lim Y, Mohanram H, Bhattacharjya S, Xing B. Lipopolysaccharide neutralizing peptide-porphyrin conjugates for effective photoinactivation and intracellular imaging of gram-negative bacteria strains. *Bioconjug Chem.* 2012; 23(8): 1639-47.
 67. Nakonieczna J, Wolnikowska K, Ogonowska P, Neubauer D, Bernat A, Kamysz W. Rose bengal-mediated photoinactivation of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced in the presence of antimicrobial peptides. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1949.
 68. Pierce S, Jennings MP, Juliano SA, Angeles-Boza AM. Peptide-ruthenium conjugate as an efficient photosensitizer for the inactivation of multidrug-resistant bacteria. *Inorg Chem.* 2020; 59(20): 14866-70.
 69. Qiu² L, Wang C, Lei X, Du X, Guo Q, Zhou S et al. Gelatinase-responsive release of an antibacterial photodynamic peptide against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Sci.* 2021; 9(9): 3433-44.
 70. Qiu L, Wang C, Lan M, Guo Q, Du X, Zhou S et al. Antibacterial Photodynamic Gold Nanoparticles for Skin Infection. *ACS Appl Bio Mater.* 2021 Apr 19; 4(4): 3124-32.
 71. Wang X, Qiu L, Wang C, Gao Z, Zhou S, Cui P et al. Nanodot-doped peptide hydrogels for antibacterial phototherapy and wound healing. *Biomater Sci.* 2022; 10(3): 654-64.

72. Zhang Y, Zhang H , Zou Q , Xing R , Jiao T , Yan X . An injectable dipeptide-fullerene supramolecular hydrogel for photodynamic antibacterial therapy. *J Mater Chem B*. 2018; 6(44): 7335-42.
73. Zhang AN, Wu W, Zhang C, Wang QY, Zhuang ZN, Cheng H et al. A versatile bacterial membrane-binding chimeric peptide with enhanced photodynamic antimicrobial activity. *J Mater Chem B*. 2019; 7(7): 1087-95.
74. Zhang D, Chen J, Jing Q, Chen Z, Ullah A, Jiang L et al. Development of a potent antimicrobial peptide with photodynamic activity. *Front Microbiol*. 2021; 12: 624465.
75. Zhao Y, Ying J, Sun Q, Ke M, Zheng B, Huang J. A novel silicon (IV) phthalocyanine-oligopeptide conjugate as a highly efficient photosensitizer for photodynamic antimicrobial therapy. *Dyes and Pigments* 2020; 107834.
76. Zhou F, Lin S, Zhang J, Kong Z, Tan BK, Hamzah SS et al. Enhancement of photodynamic bactericidal activity of curcumin against *Pseudomonas Aeruginosa* using polymyxin B. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022; 37: 102677.
77. Guo K, Zhang M, Cai J, Ma Z, Fang Z, Zhou H et al. Peptide-Engineered AIE Nanofibers with Excellent and Precisely Adjustable Antibacterial Activity. *Small*. 2022; 18(17): e2108030.
78. Vince RV, Madden LA, Alonso CM, Savoie H, Boyle RW, Todman M et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-specific peptides for targeted photoantimicrobial chemotherapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2011; 10(4): 515-22.
79. Yang K, Gitter B, Rüger R, Wieland GD, Chen M, Liu X et al. Antimicrobial peptide-modified liposomes for bacteria targeted delivery of temoporfin in photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2011; 10(10): 1593-601.
80. Bao P, Li C, Ou H, Ji S, Chen Y, Gao J et al. A peptide-based aggregation-induced emission bioprobe for selective detection and photodynamic killing of Gram-negative bacteria. *Biomater Sci*. 2021; 9(2): 437-442.
81. Pankhurst CL. Candidiasis (oropharyngeal). *BMJ Clin Evid*. 2013; 2013: 1304.
82. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 2016; 34(4): 487-94.
83. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4: 18026.
84. Grimoud AM, Lodter JP, Marty N, Andrieu S, Bocquet H, Linas MD et al. Improved oral hygiene and *Candida* species colonization level in geriatric patients. *Oral Dis*. 2005; 11(3): 163-9.
85. Compagnoni MA, Souza RF, Marra J, Pero AC, Barbosa DB. Relationship between *Candida* and nocturnal denture wear: quantitative study. *J Oral Rehabil*. 2007; 34(8): 600-5.
86. Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*. 2003; 48(4): 959-76.

87. Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. Br Dent J. 2017; 223(9): 675-81.
88. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. Clin Microbiol Infect. 2019; 25(7): 792-798.
89. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017; 57(13): 2857-76.
90. Venisse N, Grégoire N, Marliat M, Couet W. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic models of in vitro fungistatic and fungicidal effects against *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(3): 937-43.
91. Nami S, Mohammadi R, Vakili M, Khezripour K, Mirzaei H, Morovati H. Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: A comprehensive review. Biomed Pharmacother. 2019; 109: 333-44.
92. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. Biomed Res Int. 2013; 2013: 204237.
93. Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D, Sirjusingh C, Anderson JB, Kohn LM. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. J Bacteriol. 2000; 182(6): 1515-22.
94. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. Future Microbiol. 2013; 8(10): 1325-37.
95. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001; 80(3): 903-8.
96. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(2): 109-18.
97. Singh R, Kumari A, Kaur K, Sethi P, Chakrabarti A. Relevance of antifungal penetration in biofilm-associated resistance of *Candida albicans* and *non-albicans Candida* species. J Med Microbiol. 2018; 67(7): 922-26.
98. Raab O. Über die wirkung fluorescierender stoff auf Infusoria . Z Biol. 1900 3; 9: 524.
99. Szeimies RM. Geschichte der photodynamischen therapie. Akt Dermatol. 2005; 31: 193 – 97.
100. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. Biochem J. 2016; 473(4): 347-64.
101. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. Periodontol 2000. 2011; 55(1): 143-66.
102. Hamblin MR, Abrahamse H. Oxygen-independent antimicrobial photoinactivation: type III photochemical mechanism?. Antibiotics (Basel). 2020; 9(2): 53.

103. Prażmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv Clin Exp Med*. 2016; 25(4): 799-807.
104. Kashef N, Hamblin MR. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist Updat*. 2017; 31: 31-42.
105. 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.
106. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci*. 2015; 14(7): 1319-28.
107. Picco DCR, Cavalcante LLR, Trevisan RLB, Souza-Gabriel AE, Borsatto MC, Corona SAM. Effect of curcumin mediated photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*: A systematic review of in vitro studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019; 27: 455-461.
108. Lestari ML, Indrayanto G. Curcumin. profiles drug subst excip relat methodol. 2014; 39: 113-204.
109. Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A review of therapeutic effects of curcumin. *Curr Pharm Des*. 2013; 19(11): 2032-46.
110. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014; 19(12): 20091-112.
111. Yeung AWK, Horbańczuk M, Tzvetkov NT, Mocan A, Carradori S, Maggi F et al. Curcumin: total-scale analysis of the scientific literature. *Molecules*. 2019; 24(7): 1393.
112. Jayaprakasha GKL Jagan Mohan Rao, K. K. Sakariah. Chemistry and biological activities of c. longa trends in food science & technology 2005; 16(12): 533-48.
113. Forouzanfar F, Forouzanfar A, Sathyapalan T, Orafi HM, Sahebkar A. Curcumin for the management of periodontal diseases: a review. *Curr Pharm Des*. 2020; 26(34): 4277-84.
114. Borges GÁ, Rêgo DF, Assad DX, Coletta RD, De Luca Canto G, Guerra EN. In vivo and in vitro effects of curcumin on head and neck carcinoma: a systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2017; 46(1): 3-20.
115. Normando AGC, de Meneses AG, de Toledo IP, Borges GÁ, de Lima CL, Dos Reis PED et al. Effects of turmeric and curcumin on oral mucositis: A systematic review. *Phytother Res*. 2019; 33(5): 1318-29.
116. Al-Maweri SA, Alaizari N, Alharbi AA, Alotaibi SA, AlQuhal A, Almutairi BF, Alhuthaly S, Almutairi AM. Efficacy of curcumin for recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2020; 9: 1-6.
117. Rocha MP, Ruela ALM, Rosa LP, Santos GPO, Rosa FCS. Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020; 32: 101962.
118. Dubos RJ. Studies on a bactericidal agente extracted from a soil bacillus: I.preparation of the agente. Its activity *in vitro*. *J Exp Med*. 1939; 70(1): 1-10.

119. Boparai JK, Sharma PK. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Protein Pept Lett*. 2020; 27(1): 4-16.
120. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*. 2011; 29(9): 464-72.
121. Welling MM, Lupetti A, Balter HS, Lanzzeri S, Souto B, Rey AM et al. 99mTc-labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. *J Nucl Med*. 2001;42(5):788-94.
122. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*. 2003; 55(1): 27-55.
123. da Costa JP, Cova M, Ferreira R, Vitorino R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(5): 2023-40.
124. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(3): 238-50.
125. Torres MDT, Sothiselvam S, Lu TK, de la Fuente-Nunez C. Peptide design principles for antimicrobial applications. *J Mol Biol*. 2019; 431(18): 3547-67.
126. Sierra JM, Fusté E, Rabanal F, Vinuesa T, Viñas M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther*. 2017; 17(6): 663-76.
127. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010; 58(1): 15-25.
128. Bandurska K, Berdowska A, Barczyńska-Felusiak R, Krupa P. Unique features of human cathelicidin LL-37. *Biofactors*. 2015; 41(5): 289-300.
129. Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep*. 2009; 26(12): 1572-84.
130. Tsai PW, Cheng YL, Hsieh WP, Lan CY. Responses of *Candida albicans* to the human antimicrobial peptide LL-37. *J Microbiol*. 2014; 52(7): 581-9.
131. Luo Y, McLean DT, Linden GJ, McAuley DF, McMullan R, Lundy FT. The naturally occurring host defense peptide, LL-37, and its truncated mimetics KE-18 and KR-12 have selected biocidal and antibiofilm activities against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* *in vitro*. *Front Microbiol*. 2017; 8: 544.
132. Rapala-Kozik M, Bochenska O, Zawrotniak M, Wolak N, Trebacz G, Gogol M et al. Inactivation of the antifungal and immunomodulatory properties of human cathelicidin LL-37 by aspartic proteases produced by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2015; 83(6): 2518-30.
133. Holford M, Daly M, King GF, Norton RS. Venoms to the rescue. *Science*. 2018; 361(6405): 842-844.
134. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2012; 31(1-2): 173-94.

135. Park SC, Kim JY, Shin SO, Jeong CY, Kim MH, Shin SY et al. Investigation of toroidal pore and oligomerization by melittin using transmission electron microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 343(1): 222-8.
136. Lee J, Lee DG. Melittin triggers apoptosis in *Candida albicans* through the reactive oxygen species-mediated mitochondria/caspase-dependent pathway. *FEMS Microbiol Lett*. 2014; 355(1): 36-42.
137. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*. 2015; 22(2): 245-55.
138. Do N, Weindl G, Grohmann L, Salwiczek M, Koksche B, Korting HC et al. Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. *Exp Dermatol*. 2014; 23(5): 326-31.
139. Jia HR, Zhu YX, Xu KF, Wu FG. Turning toxicants into safe therapeutic drugs: cytolytic peptide-photosensitizer assemblies for optimized in vivo delivery of melittin. *Adv Healthc Mater*. 2018; 7(16) :1800380.
140. Liu H, Hu Y, Sun Y, Wan C, Zhang Z, Dai X et al. Co-delivery of bee venom melittin and a photosensitizer with an organic-inorganic hybrid nanocarrier for photodynamic therapy and immunotherapy. *ACS Nano*. 2019; 13(11): 12638-12652.
141. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc*. 1963; 2149– 54.
142. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*. 1970; 34(2): 595- 98.
143. Abreu-Pereira CA, Klein MI, Lobo CIV, Gorayb Pereira AL, Jordão CC, Pavarina AC. DNase enhances photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* biofilms. *Oral Dis*. 2022
144. Luz SCL. Terapia fotodinâmica: efetividade e mecanismos moleculares da ação da curcumina como fotossensibilizador frente a biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. [tese de mestrado] Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2019.
145. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Thirty Edition. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2)
146. Arendrup MC, Melrtiadis, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. The Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing AFST of the ESCMID European Committe for Antimicrobial Susceptibiity Testing EUCAST Method for the Determination of broth dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeast; EUCAST Definitive Document E.DEF 7.3; EUCAST: BASEL, Switzerland, 2017.
147. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida biofilms*. *Nat Protoc*. 2008; 3(12): 1909-24.
148. Fermanian J. Measure de l'accord entre deux juges: cas quantitatif. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 1984; 32: 408- 13.

149. Fisher RA. Intraclass correlations on the analysis of variance. In: Fisher RA. Statistical methods for research workers. 14th ed. Edinburg: Oliver; 1925.
150. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(1): 1.
151. Meletiadis J, Verweij PE, TeDorsthorst DT, Meis JF, Mouton JW. Assessing in vitro combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. Med Mycol. 2005; 43(2): 133-152.
152. Petraitis V, Petraitiene R, Hope WW, et al. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: in vitro and in vivo correlations of the concentration- and dose- dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(6): 2382-91.
153. Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An Introduction to terminology and methodology of chemical synergy perspectives from across disciplines. Front Pharmacol. 2017; 8: 158.
154. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EGO. Fungistatic action of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal agents. Microorganisms. 2020; 8(7): 980.
155. Tam JP, Lu YA, Yang JL. Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized beta -strand antimicrobial peptides. J Biol Chem. 2002; 277(52): 50450-6.
156. Choi H, Hwang JS, Kim H, Lee DG. Antifungal effect of CopA3 monomer peptide via membrane-active mechanism and stability to proteolysis of enantiomeric D-CopA3. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 440(1): 94-8.
157. Park C, Cho J, Lee J, Lee DG. Membranolytic antifungal activity of arenicin-1 requires the N-terminal tryptophan and the beta-turn arginine. Biotechnol Lett. 2011; 33(1): 185-9.
158. Sung WS, Lee DG. Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-disruption effect. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 369(3): 858-61.
159. Mardani M, Kamrani O. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green against the standard and fluconazole-resistant *Candida albicans*. Lasers Med Sci. 2021; 36(9): 1971-77.
160. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011; 54(2): 123-30.
161. Burrows LL, Stark M, Chan C, Glukhov E, Sinnadurai S, Deber CM. Activity of novel non-amphipathic cationic antimicrobial peptides against *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(5): 899-907.
162. Park SC, Cheong MS, Kim EJ, Kim JH, Chi YH, Jang MK. Antifungal effect of arabidopsis SGT1 proteins via mitochondrial reactive oxygen species. J Agric Food Chem. 2017 27; 65(38): 8340-47.

163. Kim DH, Lee DG, Kim KL, Lee Y. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. Eur J Biochem. 2001; 268(16): 4449-58.
164. Park C, Lee DG. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. Biochem Biophys Res Commun. 2010 26; 394(1): 170-2.
165. Ventura CR, Wiedman GR. Substituting azobenzene for proline in melittin to create photomelittin: A light-controlled membrane active peptide. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2021 1; 1863(12): 183759.
166. Guha S, Ferrie RP, Ghimire J, Ventura CR, Wu E, Sun L et al. Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. Biochem Pharmacol. 2021; 193: 114769.

APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA EXTRAÇÃO DE DADOS DA REVISÃO DE LITERATURA

Planilha1		
Formulário Extração de Dados - Revisão PDI + Peptídeos		
1		
2		
3	Data de Leitura	
4	ID do artigo	
5	Nome do Artigo:	
6	Nome do primeiro Autor:	
7	País em que foi realizado o estudo:	
8	Ano de Publicação do artigo	
9		
10	Assinale o tipo de estudo do artigo	Experimental em laboratório (in vitro)
11		Modelo animal
12		Estudo Clínico
13		Revisão sistemática de literatura
14		Revisão não sistemática de literatura
15		Relato de Caso
16		Outro
17		
18	Em caso de revisão, aponte se há algum artigo relevante nas referências que ainda não foi incluso	
19		
20	Assinale qual a forma de associação das duas terapias	Peptídeo de penetração celular acoplado com o foto
21		Ação antimicrobiana conjunta simples PDI + Peptídeo
22		União das moléculas PDI+ Peptídeo
23		
24	Qual tipo de peptídeo foi utilizado no estudo? Em qual meio foi solubilizado e quais concentrações testadas?	Natural
25		Sintético
26		Outro (explícite)
27		
28	Qual fotossensibilizador foi utilizado? Em qual meio foi solubilizado e quais concentrações testadas?	
29		
30	Em caso de estudo microbiológico, qual(is) espécie(s) foi utilizada?	
31		
32	Qual a metodologia empregada para o teste de susceptibilidade?	MIC em fundo de poço
33		MIC em placa de ágar
34		Outro
35		
36	Tipo de medida após o teste de susceptibilidade	UFC/mL
37		Teste colorimétrico
38		Microscopia
39		PCR
40		Outro
41		
42	Em caso de estudo microbiológico, a(s) espécie(s) é susceptível ou resistente?	Susceptível a que
43		Resistente a que
44		Não informado
45		
46	Em caso de efeito antiviral, o estudo avaliou:	Ação direta sobre vírus
47		Ação sobre neuraminidase e/ou hemaglutinina
48		Outros
49		
50	Em caso de estudo clínico, foi conduzido em:	Adultos (maiores de idade)
51		Crianças e Adolescentes (menores de idade)
52		
53	Em caso de estudo clínico, qual a faixa etária dos voluntários?	
54		
55	Considerando o objetivo do artigo, a associação da PDI + Peptídeos apresentou eficácia?	Sim
56		Não
57		
58	Se houve eficácia, explique os parâmetros:	Concentração do peptídeo
59		Concentração do Fotossensibilizador
60		Tempo de pré-irradiação
61		Dose de luz
62		Comprimento de onda da luz utilizada
63		
64	A eficácia apresentada tem significância estatística?	Sim
65		Não
66		
67	A significância estatística foi verificada com base no	Valor de p
68		Intervalo de confiança
69		
70	O artigo sugere alguma hipótese quanto ao mecanismo de ação? Se sim, explique.	
71		
72		
73		
74		
75		
76		
77		
78		
79		
80		
81		
82		
83		
84		
85		

APÊNDICE B – ARTIGO RESULTANTE DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA LITERATURA¹

Potencial da associação de peptídeos com Inativação Fotodinâmica para eliminação de microrganismos de interesse médico: Revisão de Escopo

Nathália dos Santos Fusco^a (<https://orcid.org/0000-0002-4649-251X>; nathaliasantosfusco@hotmail.com)

Isadora Machado de Agostino^b (<https://orcid.org/0000-0003-2065-6667>)

Norival Alves Santos-Filho^c (<https://orcid.org/0000-0002-0344-6900>)

Lívia Nordi Dovigo^d * (<https://orcid.org/0000-0002-5435-7609>; livia.dovigo@unesp.br)

^a Master student, Department of Social Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP). Araraquara-SP, Brazil.

^b Undergraduate student, Department of Social Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP). Araraquara-SP, Brazil.

^c Assistant professor, Department of Biochemistry and Organic Chemistry, São Paulo State University (UNESP). Araraquara-SP, Brazil.

^d Associate professor, Department of Social Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP). Araraquara-SP, Brazil.

*Correspondence and requests for materials should be addressed to Lívia Nordi Dovigo (email: livia.dovigo@unesp.br)

Department of Social Dentistry, School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP).

Rua Humaitá 1680, CEP 14801-903 Araraquara-SP, Brazil.

Telephone: +55 (16) 3301-6549

RESUMO

A capacidade que um microrganismo possui de resistir a efeitos de fármacos que anteriormente eram capazes de eliminá-los é chamada de resistência microbiana. Devido ao fato deste fenômeno crescer a cada dia, tratamentos alternativos são extremamente necessários. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDI) em associação com peptídeos são promissoras para eliminação de microrganismos de interesse médico. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo analisar a eficácia da associação das duas terapias para efeito antimicrobiano. Para isso, foi conduzido uma revisão bibliográfica afim de realizar um mapeamento da literatura existente a cerca deste tema utilizando de uma busca sistemática para a seleção dos artigos. Trinta e nove artigos foram identificados por meio das buscas em bases de dados Pubmed, Lilacs, Scopus e Scielo. De forma geral os peptídeos selecionados para os estudos de associações aparecem com maior heterogeneidade do que os fotossensibilizadores. Com exceção de apenas cinco associações, a grande maioria apresentou eficácia antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos, susceptíveis e resistentes a medicamentos apresentados pelo mercado farmacêutico. Dessa forma é possível concluir que a utilização de peptídeos em associação com a PDI mostra-se como um tratamento promissor contra microrganismos que afetam a saúde global.

Palavras-Chave

Resistência Microbiana a Medicamentos; Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos; Fotoquimioterapia

¹ Após a defesa de dissertação, o artigo será traduzido para o inglês e então submetido à publicação.

Introdução

A resistência microbiana é a capacidade (intrínseca ou adquirida) de um microrganismo para resistir a efeitos de fármacos que deveriam ser capazes de eliminá-lo. Tal termo abrange bactérias, vírus, parasitas e fungos com grande importância tanto clínica quanto epidemiológica.^{1,2} A resistência se tornou uma séria preocupação do século 21, declarada pela OMS como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública,² uma vez que patógenos multirresistentes são responsáveis pela morte de aproximadamente 700.000 indivíduos anualmente.^{1,3} Ao mesmo tempo, nos últimos anos houve uma escassez no desenvolvimento de novos antimicrobianos, dessa forma, a ascensão da resistência microbiana parece estar superando a descoberta e aprimoramento de novos tratamentos.⁴ Contudo, algumas alternativas tem mostrado potencial para driblar a resistência, como é o caso dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) e da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

Os peptídeos são grupos de moléculas heterogêneas, produzidas por uma extensa variedade de tecidos e células pela maioria das espécies como procariontes, plantas, anfíbios, insetos e mamíferos, incluindo os seres humanos. Eles são responsáveis, entre outras coisas, por compor a resposta imune inata de organismos multicelulares, contém atividades microbidas e imunomoduladoras, e contribuem significativamente no mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções.^{5,6,7} Mais particularmente em relação aos PAMs, por conta da sua natureza hidrofóbica e catiônica, a interação inicial com as membranas celulares acontece devido a presença de lipídios carregados negativamente nessas membranas, os quais interagem com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente nos peptídeos; desse modo, os AMPs são atraídos eletrostaticamente para as superfícies microbianas. Uma vez presente na membrana, os peptídeos iniciam uma série de interações capazes de gerar danos em sua arquitetura.⁸ Sendo assim, por conta do seu mecanismo de ação não se tratar de um alvo específico, e sim por propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade e carga, as chances de patógenos manifestarem mecanismos de resistência a eles são baixas.⁸

Outra terapia com potencial efeito antimicrobiano é a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana aPDT. Surgida no início do século XX, inicialmente foi intensamente explorada na área médica no tratamento anticâncer.⁹ Todavia, os olhares dos pesquisadores se voltaram para a aPDT no início de 1990, a partir do surgimento das primeiras infecções resistentes a medicamentos no setor de saúde.¹⁰ Para que seu processo ocorra, a aPDT requer a combinação de três fatores, sendo eles uma molécula chamada de fotossensibilizador (FS), luz correspondente ao comprimento de onda de absorção específica da molécula, apropriada para a excitação do FS e presença de oxigênio.^{11,12,13} Primeiramente, a célula-alvo deve ser tratada com FS, processo chamado de fotossensibilização. Posteriormente, é realizada a sensibilização com luz, em comprimento de onda adequado. Após absorção de um fóton de luz com comprimento de onda adequado¹⁴, o fotossensibilizador sai de seu estado fundamental para um estado eletronicamente excitado. A partir disso ele pode voltar ao seu estado normal por meio de fosforescência ou por dois mecanismos geradores de espécies reativas de oxigênio (EROs):¹⁰ reagir diretamente com substrato formando íons radicais que interagem com oxigênio e gera produtos oxigenados (reação do Tipo I), ou, transferir sua energia para o oxigênio diretamente e formar o oxigênio singlete, uma espécie oxidativa altamente reativa, que pode oxidar muitas moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos (reação do Tipo II).¹⁵ Essas duas

reações podem ocorrer simultaneamente e são grande parte influenciadas pelo fotossensibilizador, substrato e concentração de oxigênio.^{10,12} Os radicais gerados atuam na membrana celular, permitindo a internalização adicional de FS, e posteriormente, as EROs causam desequilíbrio na homeostase celular, que resulta em morte por apoptose, necrose ou autofagia.¹¹ De forma geral, a aPDT possui algumas vantagens em relação aos antibióticos convencionais como amplo espectro de ação, danos muito limitados ao hospedeiro, utilização de fontes de luz de baixo custo para ativação do fotossensibilizador, pequena probabilidade de promover mutações genéticas nos microrganismos,¹⁶ e principalmente, é quase nula as chances de micróbios desenvolverem resistência a ela, já que funciona a partir da geração de EROs que atua em diversas moléculas microbianas, e não somente em um sítio específico.¹⁷

Apesar de possuírem mecanismos de ação distintos, a associação de peptídeos antimicrobianos com aPDT já vem sendo investigada em função da provável potencialização dos efeitos fotodinâmicos e do improvável desenvolvimento de resistência por ambas terapias. Assim, esta revisão realizou um mapeamento da literatura existente acerca da utilização de peptídeos em associação com Inativação Fotodinâmica para eliminação de microrganismos.

Material e métodos

Estratégia de busca, critérios de elegibilidade e seleção dos artigos

O processo de busca dos artigos foi finalizado em 19 abril de 2022. Bancos de dados eletrônicos, incluindo Medline (Pubmed), Lilacs (BVS), Scopus e Scielo foram pesquisados para Peptídeos Antimicrobianos em associação com aPDT com finalidade antimicrobiana. A estratégia de busca foi específica para cada base de dados. Foram utilizadas palavras-chave ou termos relacionados à Peptídeos e aPDT ((((((Photochemotherapy) OR (Photochemotherapies)) OR (Photodynamic Therapy)) OR (photoinactivation)) OR (Photoradiation)) OR (Photosensitizing Agents) AND peptides). Para garantir uma estratégia de busca mais sensível, nenhuma restrição de tipo de estudo ou população foi usada. Não houve limite quanto à data de publicação, mas foram aceitos apenas artigos em Inglês ou Português. Para ser incluído nessa revisão, os trabalhos satisfizeram os seguintes critérios de elegibilidade: (a) pesquisas que investigaram o efeito da associação de peptídeos com agentes fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana; (b) pesquisas que investigaram o uso de peptídeos com potencial fotossensibilizador com finalidade antimicrobiana.

Os trabalhos identificados por meio da estratégia de busca foram inicialmente rastreados para remoção de duplicatas utilizando-se para isso o gerenciador de referências Mendeley (Mendeley Desktop versão 1.19.4 © 2008-2019 Mendeley Ltd). Em seguida, foram examinados todos os títulos e resumos dos estudos pré-selecionados com o software Rayyan (<https://rayyan.qcri.org/>) para aplicação dos critérios de elegibilidade. O software tornou possível classificar cada referência como incluída, excluída ou incerta. Registros classificados como 'incertos' foram discutidos com o grupo de pesquisa para a decisão final.

Coleta de dados

Um formulário foi desenvolvido para orientar a extração de dados dos artigos selecionados bem como para padronizar as informações que seriam extraídas de todos os trabalhos. Este formulário foi desenvolvido com base nos objetivos específicos da revisão de escopo e quais informações seriam relevantes para serem discutidas. Previamente sua aplicação, foi realizado pré-teste em uma amostra aleatória de três estudos. Em seguida, o formulário sofreu ajustes e então foi finalizado em sua versão final para a aplicação definitiva (Material Suplementar A).

RESULTADOS

As buscas resultaram em 97.185 trabalhos, dos quais 885 estavam duplicados e 3.476 estavam em idiomas não aceitos. Assim, 92.824 estudos foram pré-selecionados para aplicação dos critérios de elegibilidade, o que resultou na seleção final de 39 trabalhos (Figura 1).

A publicação do primeiro estudo identificado a respeito da associação da aPDT com peptídeos ocorreu no ano de 2000 e, subsequente, houve um crescimento na quantidade de estudos, com exceção dos anos 2015 e 2016, nos quais não foram identificadas publicações (Figura 2).

Figura 1 - Diagrama de fluxo PRISMA ilustrando a estratégia de busca. Este fluxograma apresenta as fases de identificação e seleção dos artigos, que resultaram na identificação de 39 artigos considerados elegíveis para inclusão na revisão.

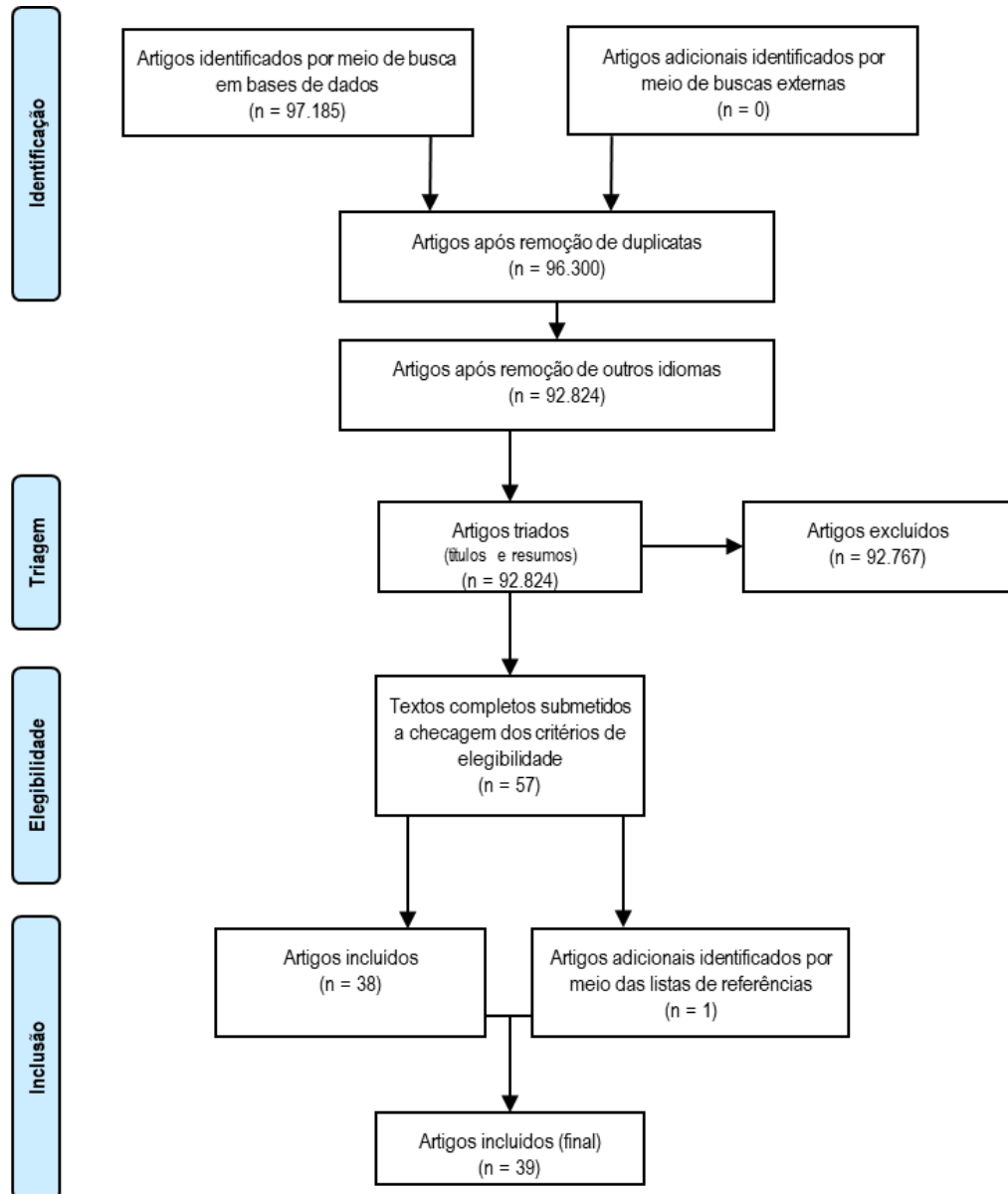
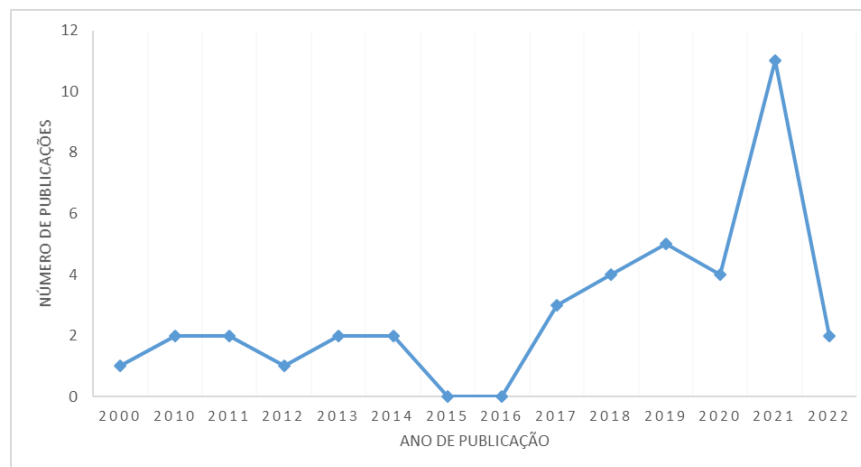


Figura 2- Número de publicações sobre aPDT em associação com peptídeos identificadas até abril de 2022.



Durante o processo de seleção dos trabalhos, foram identificadas 5 revisões de literatura, as quais foram utilizadas somente para checagem das referências. Todos os estudos identificados utilizaram delineamento laboratorial (*in vitro*) para a avaliação do efeito antimicrobiano. Em 14 estudos^{21,22,27,29,30,31,37,41,42,44,46,47,48,49} também foram descritos testes de citotoxicidade, e em outros 14^{21,30,31,33,41,42,46,47,49,51,52,53,54,58} também foram incluídas testagem *in vivo*.

Dos estudos em que foram realizadas testagem *in vivo*, todos os 14 utilizaram modelo animal em camundongos para simulação de infecções. Dentre eles, foram identificados estudos com modelo animal de periodontite (1),⁴² infecções de córnea (1)³² e implantação de cateteres revistos por biofilme (1)²² As análises mais realizadas foram análise histopatológica (9)^{21,32,33,41,42,46,47,49,52}, oito^{21,30,31,33,41,47,54,56} realizaram medidas de UFC/mL e 4 realizaram análises a partir de amostras sanguíneas.^{32,22,52,53}

Com relação aos microrganismos investigados, dos 39 estudos incluídos, 29 testaram o efeito antimicrobiano sobre culturas de *Staphylococcus aureus* (Tabela 1), em seguida, *Escherichia coli* com 25 estudos (Tabela 2), logo após *Pseudomonas aeruginosa* com 14 (Tabela 3). Outras espécies apareceram com menor frequência (Tabela 4) como, por exemplo, *Staphylococcus epidermidis* (4 estudos), *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (3 estudos) e *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (2 estudos).

A maioria dos trabalhos (25 artigos) realizou a associação das duas terapias por meio de conjugação, ou seja, realizaram a união das moléculas do fotossensibilizador e do peptídeo através de uma ligação química. O fotossensibilizador mais utilizado dentro das conjugações foi a porfirina e seus derivados (porfirina, protoporfirina, isômero de porfirina, tetrafenilporfirina de zinco e 5[4'-carboxifenil]-10,15,20-trifenilporfirina) (12)^{18,20,26,48,50,43,27,28,39,29,52,37} O segundo FS em maior número foi o fotossensibilizador de segunda geração Clorina e6 (4)^{41,38,42,46}. Na sequência foram encontrados estudos com ftalocianina e seus derivados (3)^{54,52,53,23} Eosina Y (2)^{35,36} AIEgens (2)^{19,56} e por fim Rutênio (1)⁴⁵ e clorofila (1).²¹ Com relação aos peptídeos, observou-se grande

variabilidade, entretanto os que mais se destacaram foi polimixina B (3)^{38,39,19} KLAKLAK (3)^{35,36,52} Apidaecidina-1b (2)^{26,27} TAT (2)^{20,42} e Buforina-2 (2)^{28,45}

De forma geral, os conjugados FS + peptídeo demonstraram boa eficácia contra os microrganismos estudados. Entretanto, no conjugado apresentado por leguern2017¹, apenas o fotossensibilizador já causou resultado antimicrobiano compatível ao da conjugação.³⁸ Os conjugados apresentados por Polo et al.¹⁸ e Dosseli et al.²⁸ mostraram efeito de morte contra linhagens celulares de fibroblastos. Além disso, em 3 estudos os conjugados não obtiveram sucesso, em Vince et al.⁴⁸ contra *E.coli*; Yang et al.⁵⁰ contra *P. aeruginosa* e em Bao et al.¹⁹ contra *E. faecalis* e *S.mutans*.

Quatro estudos avaliaram a atividade sinérgica das terapias sem conjugação, ou seja, utilizaram o fotossensibilizador na presença do peptídeo. Dentre esses estudos os fotossensibilizadores que mais foram utilizados foi a curcumina (2)^{24, 55} azul de metileno e clorina Ce6 (2)^{24,25} e por fim a rosa-bengala (1).⁴⁴ Já os peptídeos utilizados foram monômero e dímero de aureína 1,2 (2)^{24,25}, camel e pexiganan 9 (1)⁴⁴ e polimixina B (1).⁵⁵ Em todas as 4 associações, o efeito antimicrobiano foi potencializado, exceto em Defreitas2018 contra *E. faecalis* no qual a combinação da curcumina com o peptídeo Aureína 1.2 melhorou sutilmente a redução bacteriana em comparação com a curcumina após irradiação, mas não em comparação com o peptídeo sozinho.

Também foi identificado 1 estudo³³ no qual o peptídeo polimixina B atuou como o próprio fotossensibilizador. Nesse trabalho foram utilizadas amostras de *E. coli* resistente à canamicina e os autores mostraram que o valor de UFC/mL diminui 3,9 ordens de magnitude em relação aos microrganismos não irradiados.³³

Por fim, 9 artigos avaliaram outras formas de associação. Por exemplo, Zhang2018, Cai2021 e Wang2022 realizaram formulações com géis a base de peptídeo com o fotossensibilizador incorporado. Além de associações com diferentes moléculas como a betaciclodextrina (um carboidrato)³², nanocristais de celulose⁴⁰ nanopartículas²¹ e nanopartículas de oligômeros.³⁴ Outras formas de união química entre FS e peptídeo também foram realizadas em Qiu2021⁴⁷ e Gao2021.

Tabela 1 – Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Staphylococcus aureus*.

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Polo2000	MRSA 110	Meticilina	Porfíriceno (isômero da porfirina)	Polilisina*	Houve efeito de morte em função do tempo de irradiação do conjugado.
Dosseli2010	ATCC BAA 44	Meticilina	5 (4'-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (cTPP)	Apidaecina 1b*	O efeito de morte do PS foi potencializado com o uso do conjugado.
Bourré2010	8325-4	Não informado	Porfirina	Tat GRKKRRQRRRPQ*	Após irradiação, o efeito foi dependente da concentração do conjugado. As espécies Gram (+) foram mais sensíveis do que as espécies Gram (-).
Vince2011	MRSA	Meticilina	Porfirina	PEP12 CGPGSGREHARGVRGGPC*	Após irradiação com luz vermelha, houve diminuição no crescimento desta cepa.
Yang2011	DSM11729	Meticilina	Temoporfina	WLB2*	Houve efeito de morte em função da concentração de temoporfina.
Johnson2013	ATCC 29213	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da ação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Dosseli2013	MRSA	Meticilina	Porfirina	Apidaecina 1b*	O efeito de morte dependeu do tipo de conjugado porfirina+apidaecina 1b. Diferentes tempos de incubação não resultou em grandes diferenças.
Johnson2014	ATCC 29213	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	O objetivo foi explicitar como este conjugado atua nos microorganismos estudados, já que "Johnson2013" demonstrou a eficácia do conjugado contra as cepas em questão.
Dosseli2014	ATCC BAA-44	Meticilina	Porfirina	Buforina 2 e magainina 2*	Houve efeito de morte maior para o conjugado com magainina do que com a buforina. O teste aPDT com fibroblastos em concentrações pequenas e menores tempos de incubação induziram a morte completa das células.
Leguem2017 ¹	CIP7625	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte igual para o PS sozinho e para o conjugado.
Leguem2017 ²	Não informado	Não informado	Porfirina	Polimixina B*	Em relação ao conjugado produzido em "Leguem2017 ¹ ", este novo composto apresentou pouca influência contra esta cepa.
Leguem2017 ³	CIP7625	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B****	O nanocrystal de celulose ligado a clorina sozinha, e o nanocrystal + clorina + peptídeo tiveram efeito fotobactericida.
Cai2018	Não informado	Não informado	Clorofila	Purpurin 18*	O conjugado apresentou morte específica de <i>S. aureus</i> , e MIC 4x menor que a vancomicina. Também apresentou eficiência terapêutica em modelos de infecção em camundongos.
Zhang2018†	Não informado	Multiresistente	Derivado de fullereno (C60 pirimidina Tris-ácido, C60-PTC)	Fmoc-FF****	Após irradiação, nenhuma colônia de bactérias foi observada no grupo tratado com o conjugado e apenas 4,2% das bactérias foram mortas pela solução apenas com o PS.
Gao2019	Não informado	Meticilina	Ce6 foi enxertado em α -ciclodextrina	Magainina 1 conjugado com polietilenoglicol****	Apenas com o PS já houve redução bacteriana, porém quando utilizado o conjugado peptídeo + PS a redução foi ainda maior.
Zhang2019†	CMCC (B) 26003	Não informado	Protoporfirina IX (PpIX)	(KLAKLAK) 2*	Houve efeito de morte com o conjugado peptídeo + PS maior do que quando usado apenas o PS sozinho. Também apresentou eficiência terapêutica em modelos de infecção em camundongos.
Defreitas2019	ATCC 25923	Sem resistência	Azul de metileno e clorina Ce6	Monômero e dímero de aureína 1,2**	Houve inibição no processo de formação de biofilme.

Tabela 1 – Cont.

Zhao2020	Não informado	Não informado	Ptalocianina de silício (SiPc)	Tri-arginina (oligopeptídeos)*	O efeito bactericida foi dose-dependentes. O conjugado apresentou maior efeito para esta espécie. Também apresentou eficiência terapêutica em modelos de infecção em camundongos.
Lei2020†	ATCC 6538	Sem resistência	Clorina e6	Tet213 (KRWWKWWRR)*	Um conjugado específico (AMP2-Ce6) mostrou atividade antibacteriana com um valor de MIC em torno de 3,2 µM sem foto-irradiação e <0,1 µM após irradiação, além do efeito em infecção em camundongos.
Jiang2020	ATCC 6538	Sem resistência	-	Polimixina B***	A eficiência de morte do peptídeo melhorou em 3,9 ordens de magnitude na luz em comparação com o escuro.
Cai2021†	ATCC 43300	Meticilina	Indocianina verde (ICG) e MnBr(CO) 5	Nanogel à base de dendrímero de peptídeo (G3KBPY)****	Após a irradiação a laser a atividade antibacteriana foi aumentada em relação as controles (sem luz, apenas PS e apenas peptídeo).
Cai2021†	ATCC 25922	Não informado	Indocianina verde (ICG) e MnBr(CO) 5	Nanogel à base de dendrímero de peptídeo (G3KBPY)****	Após a irradiação a laser a atividade antibacteriana foi aumentada em relação as controles (sem luz, apenas PS e apenas peptídeo).
Jiang2021	Não informado	Não informado	-	Polimixina B****	Conjugaram nanopartículas de oligômero com o peptídeo. Para esta espécie, a taxa de sobrevivência não foi afetada pelo conjugado sem luz e com luz.
Judzewitsch2021	Não informado	Não informado	Tetrafenil porfirina de zinco (ZnTPP)	Miméticos de peptídeo*	Foram sintetizados vários polímeros diferentes. Após irradiação todos mostraram eficácia. Nos polímeros de maior peso molecular, a irradiação de luz foi menos influente.
Qiu2021†	ATCC 6538	Sem resistência	Clorina e6	GKRWWKWWRR****	Após irradiação, as células foram completamente erradicadas.
Qiu2021†	ATCC 6538	Sem resistência	Clorina e6	GKRWWKWWRR*	Houve efeito inibitório no crescimento desta cepa de maneira dependente da concentração e do tempo de irradiação. Esta espécie se mostrou mais sensível em comparação a E.coli.
Zhang2021†	ATCC 6538	Sem resistência	Ptalocianina lipofílica	RWRWRW*	Sob iluminação, induziu redução de até 5 log desta cepa
Zhang2021†	ATCC 33591	Meticilina	Ptalocianina lipofílica	RWRWRW*	Sob iluminação, induziu morte semelhante ao observado na cepa sem resistência.
Chu2021	ATCC 25923	Sem resistência	Ptalocianina	RRLCRIWVIRVCRR*	Após iluminação, este conjugado exibiu uma redução de 10 ⁵ vezes em UFC/mL
Chu2021	19-364714	Meticilina	Ptalocianina	RRLCRIWVIRVCRR*	Contra o isolado clínico, a redução foi ligeiramente inferior ao da cepa tipo ATCC.
Wang2022†	ATCC 6538	Sem resistência	Sulfeto de cobre	GIKKIKIKIKI GRADARADARADA-NH ₂ ****	Sintetizaram um hidrogel a base de peptídeo com nanopontos de sulfeto de cobre. O hidrogel foi capaz de matar as bactérias de maneira dependente da concentração além de inibir em 90% a formação de biofilme.
Guo2022†	Não informado	Sem resistência	AlEgens	HHC36(AMP), di(triptofano (W2), poliarginina(R18) e polilisina(K18))*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta cepa após irradiação
Guo2022†	MRSA	Meticilina	AlEgens	HHC36(AMP), di(triptofano (W2), poliarginina(R18) e polilisina(K18))*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta cepa após irradiação com excessão do AlENF+AMP

Tabela 2 - Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Escherichia coli*.

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Polo 2000	O4	Não informado	Porfice no (isômero da porfina)	Pollisina*	Esta espécie foi menos fotosensível que as gram positivas. Em concentrações a uma metade houve perda de 95% na viabilidade celular. Nestas concentrações houve extensa diminuição na sobrevivência de fibroblastos.
Dosseli 2010	ATCC 259 22	Não informado	5-(4'-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfina (CTPP)	Apidaecina 1b*	Houve efeito de morte após irradiação, com redução de 3-4 log ₁₀ , sendo que na mo FS na mo peptídeo, sozinhos ou associados (se meligação química), mostraram atividade bactericida após a iluminação.
Bourré 2010	ATCC 259 22	Não informado	Porfina	Tat (GRKKRRQRRRPPQ)*	Após irradiação, o efeito bactericida em todas as espécies foi dependente da concentração de Tat-porfina.
Vince 2011	Não informado	Não informado	Porfina	PEP12CGPGSGREHARGVRGGPC*	Não houve efeito de morte após incubação e irradiação como conjugado.
Liu 2012	ATCC 538 08	Sem resistência	Proto-Porfina	AMP Y113WF*	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Liu 2012	BL 21	Ampicilina	Proto-Porfina	AMP Y113WF*	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Johnson 2013	BL 21 DE 3	Ampicilina	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da fotoinativação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Dosseli 2013	ATCC 259 22	Não informado	Porfina	Apidaecina 1b*	Testaram vários conjugados diferentes. Todos tiveram efeitos dependentes da concentração com eficiência que depende do tipo de conjugado. Testaram diferentes tempos de incubação mas o maior não afetou o resultado de morte.
Johnson 2014	BL 21 DE 3	Ampicilina	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	Este artigo teve como objetivo explicitar como o conjugado atua nos microrganismos estudados, já que um artigo do mesmo grupo humano antes provou a eficácia do conjugado.
Dosseli 2014	ATCC 259 22	Não informado	Porfina	Buforina 2 e magainina 2*	Houve efeito de morte maior para o conjugado com magainina do que com buforina. O teste a PDT com fibroblastos em concentrações pequenas e menores tempos de incubação induziu a morte completa das células.
Leguerm 2017 ¹	CIP54 BT	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte na conjugação peptídeo + FS. Nesta espécie, só o FS não causou atividade.
Leguerm 2017 ²	Não informado	Não informado	Porfina	Polimixina B*	Em relação ao conjugado produzido em "leguerm 2017 ¹ ", este novo composto apresentou eficácia semelhante ao antigo estudo contra esta espécie.
Leguerm 2017 ⁵	CIP54 BT	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B****	O nanocrystal de celulose ligado a clorina + peptídeo foi mais eficiente para esta cepa do que apenas o nanocrystal + clorina.
Zhang 2019†	MG 1655	Não informado	Protoporfina IX (PPIX)	(KLAKLAK) 2*	Houve efeito de morte como conjugado peptídeo + FS maior do que quando usado apenas o FS.
Zhao 2020†	Não informado	Não informado	Ftalocianina de silício (SiPC)	Tri-arginina (oligopeptídeos)*	O efeito de morte do conjugado foi dose-dependente e sem toxicidade escura. Este conjugado possuiu maior captação por parte da célula e geração de EROS.
Pierce 2020	MG 1655	Sem resistência	Rutênio	Buforina 2*	Sem irradiação, tanto a buforina II sozinha quanto o conjugado mostraram a mesma MIC. Quando adicionado irradiação de luz o conjugado mostrou decréscimo de 32 vezes em sua MIC.
Pierce 2020	AR 0114	Carbapenêmicos e Quinolonas	Rutênio	Buforina 2*	Sem irradiação, o conjugado foi mais ativo que a buforina 2 sozinha.
Jiang 2020	BL 21	Canamicina	-	Polimixina B****	Valor de UFC/mL tratado como peptídeo diminui 3,9 ordens de magnitude na luz em comparação com o escuro.
Bao 2021	Não informado	Não informado	AIEge n AIE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B*	Houve certa toxicidade escura para esta espécie e após a irradiação com luz branca houve uma letalidade bacteriana de mais de 95%.
Ca i 2021†	ATCC 259 23	Não informado	Indocianina verde (ICG) e MnBr(CO) 5	Nanogel à base de dendrímero de peptídeo (G3KBPY)****	Após a irradiação a laser a atividade antibacteriana foi aumentada em relação aos controles.
Jiang 2021	Não informado	Canamicina	-	Polimixina B****	Conjugaram nanopartículas de oligômero como peptídeo. Para esta espécie, a UFC/mL tratada como conjugado diminuiu cerca de 3,8 ordens sob irradiação em comparação com o escuro.
Qiu 2021 ^{2†}	ATCC 8739	Não informado	Clorina e6	GKRWWKWWRR****	Após irradiação o efeito antibacteriano foi significativamente maior.
Qiu 2021†	ATCC 259 22	Não informado	Clorina e6	GKRWWKWWRR*	Houve efeito de morte em função da concentração e do tempo de irradiação. Esta espécie se mostrou menos sensível em comparação com <i>S. aureus</i> .
Zhang 2021†	ATCC 8739	Não informado	Ftalocianina lipofílica	RWRWRW*	Sob iluminação houve redução de 3 log em baixa concentração (2 µM).
Chu 2021	ATCC 259 22	Não informado	Ftalocianina	RRLCRVWVIRVCRR*	Após irradiação, a eficiência de morte foi significativamente aumentada.
Chu 2021	19-117441	Não informado	Ftalocianina	RRLCRVWVIRVCRR*	Os resultados para o isolado clínico são semelhantes a cepa ATCC.
Wang 2022†	ATCC 8739	Não informado	Sulfeto de cobre	GIIKKIKKIKKIGRADARADARADA-NH2****	Sintetizaram um hidrogel à base de peptídeo com nanopontos de sulfeto de cobre. O efeito foi dependente da concentração. Foi mais eficiente para esta espécie do que para <i>S. aureus</i> .
Guo 2022†	Não informado	Não informado	AIEge n	HHC36(AMP), ditriptofano (W2), poliariginina (R18) e pollisina (K18)*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta espécie após irradiação.

Tabela 3 – Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Bourré2010	PA01	Não informado	Porfirina	Tat GRKKRRQRRRPPQ*	Após irradiação, o efeito bactericida foi dependente da concentração de Tat-porfirina.
Dosseli2010	ATCC 25668	Não informado	5 (4'-carboxifenil) -10,15,20-trifenilporfirina (cTPP)	Apidaecina Ib*	Houve redução de 2 log ₁₀ de UFC/mL utilizando concentrações maiores do que para outras espécies, e nenhuma fotodestruição aconteceu para peptídeo e FS sozinhos.
Yang2011	DSM1117	Não informado	Temoporina	WLBU2 *	Este conjugado apresentou pouco efeito tóxico sobre este microorganismo.
Johnson2013	ATCC 27853	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	O efeito bactericida do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Leguén2017 ¹	CIP76110	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte na conjugação peptídeo + FS. Apenas o FS não causou efeito.
Leguén2017 ²	Não informado	Não informado	Porfirina	Polimixina B*	Em relação ao conjugado produzido em "Leguén2017" ¹ , este novo composto apresentou eficácia semelhante ao antigo estudo.
Leguén2017 ³	CIP76110	Não informado	Porfirina	Polimixina B****	O nanocristal de celulose ligado a clorina + peptídeo foi mais eficiente do que apenas o nanocristal + clorina.
Nakoneczna2018	ATCC 10145	-	Rosa - bengala	CAMEL e pexiganan 9**	Houve efeito de morte após a associação peptídeo + FS + irradiação.
Nakoneczna2018	35 isolados clínicos	14 eram multiresistentes	Rosa - bengala	CAMEL e pexiganan 9**	A combinação pexiganan 9 + aPDT inativou quase todos os isolados clínicos, com exceção de apenas um.
Gao2019	Não informado	Não informado	Clorina e6	Magainina 1 conjugado com polietilenoglicol****	Após a irradiação, apenas o FS exibiu efeito de inativação do biofilme, porém o conjugado AMP-FS foi mais eficaz.
Pierce2020	AR 0229	Cefalosporina e quinolonas	Rutênio	Buforina 2 *	O conjugado foi eficaz contra essa espécie, tendo um aumento na sua atividade de ≥32 vezes
Han2020†	Não informado	Não informado	Clorina e6 (Ce6) conjugada com β-ciclodextrina	(YGRKKRRQRRR-GPLGVRG-EEEEEE)****	Os peptídeos continham a função de não deixar o conjugado aderir a células não bacterianas e também melhoraram a eficácia antibacteriana da aPDT.
Gao2021†	ATCC 27853	Não informado	Clorina e6	Polipeptídeo catiônico (Pep) ****	Houve efeito de morte em função da concentração e do tempo de irradiação. Também foi capaz de erradicar biofilme.
Judzewitch2021	Não informado	Não informado	Tetrafenil porfirina de zinco (ZnTPP)	Miméticos de peptídeo*	Sintetizaram vários polímeros diferentes. Todos os conjuntos de polímeros apresentaram efeito após irradiação, com exceção de "P1-3".
Zhou2021	ATCC.9027	Não informado	Curcumina	Polimixina B**	A combinação de polimixina B e aPDT mediada por curcumina mostrou atividade bactericida significativamente maior em comparação com curcumina ou polimixina B.

Tabela 4- Resumo das informações obtidas nos estudos que utilizaram cepas de diferentes espécies.

ESTUDO	CEPA	RESISTÊNCIA	FOTOSSENSIBILIZADOR	PEPTÍDEO	PONTOS PRINCIPAIS DE DESFECHO
Johnson 2013	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Multiresistente	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da fotoinativação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Pierce 2020	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Multiresistente	Rutênio	Buforina 2*	Sem irradiação, o conjugado foi mais ativo que a buforina 2 sozinha.
Polo 2000	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Não informado	Porfírico (isômero da porfina)	Polilisina*	O conjugado não teve efeito tóxico no escuro, enquanto uma irradiação eficiente foi induzida pela exposição à luz na concentração de 1 µM.
Pierce 2020	<i>Bacillus subtilis</i>	Não informado	Rutênio	Buforina 2*	Sem irradiação, o conjugado já foi 4 vezes mais ativo que o peptídeo sozinho. Após irradiação o conjugado mostrou decréscimo na MIC de 16 vezes.
Polo 2000	<i>Candida albicans</i>	Não informado	Porfírico (isômero da porfina)	Polilisina*	O conjugado não teve efeito tóxico no escuro, enquanto uma irradiação eficiente foi induzida pela exposição à luz na concentração de 1 µM.
Zhao 2020†	<i>Candida albicans</i>	Não informado	Ftaloxianina de silício (SiPc)	Triarginina (oligopeptídeos)*	Houve efeito de morte dose-dependente e dificilmente tóxico no escuro. Comparado com os controles do estudo, possuiu maior captação por parte da célula e geração de EROS.
Jiang 2021†	<i>Candida albicans</i>	Não informado	-	Polimixina B****	Conjugaram na partícula de oligômero como peptídeo. Para esta espécie, a taxa de sobrevivência não foi afetada pelo conjugado sem luz e com luz.
De Freitas 2018	<i>Enterococcus faecalis</i>	Resistente mas não especificado	Azul de metileno, curcumina e clorina-e6	Aureína 1,2**	A combinação de CUR-PDI com AU melhorou um pouco a redução bacteriana em comparação com CUR-PDI sozinho, mas não em comparação com AU sozinho. A combinação de AU com Ce6-PDI e MB-PDI, levou a eliminação total de bactérias.
De Freitas 2019	<i>Enterococcus faecalis</i>	Não informado	Azul de metileno e clorina Ce6	Monômero e dímero de aureína 1,2**	A terapia combinada, especificamente com PDI e o dímero de aureína, inibiu o processo de formação de biofilme. O ácido lipotéico é o ponto de ancoragem de ambos os peptídeos na parede celular de E. faecalis
Bao 2021	<i>Enterococcus faecalis</i>	Não informado	AlEge n AlE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B*	Nesta espécie, a adição do conjugado sem luz não alterou em nada a sobrevivência. Mesmo após a irradiação, ainda não houve efeito de morte.
De Freitas 2019	<i>Enterococcus faecium</i>	Não informado	Azul de metileno e clorina Ce6	Monômero e dímero de aureína 1,2**	A terapia combinada, especificamente com PDI e o dímero de aureína, inibiu o processo de formação de biofilme.
Liu 2012	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicilina	Proto-Porfirina	AMP Y113WF*	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Pierce 2020	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	β-lactâmicos e aminoglicosídeos	Rutênio	Buforina 2*	O conjugado foi eficaz contra essa cepa, tendo um aumento na sua atividade de ≥16 vezes.
Feese 2019	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Não informado	Porfina	Diversos peptídeos diferentes*	Toda a série de conjugados testados foram classificadas como excelentes FSs (inativação de 3-4 unidades logarítmicas) para concentrações tão baixas quanto 0,25 ou 0,5 µM.
Li 2021†	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Não informado	Clorina-e6	TAT (HOOC YG RKKRRQRRRC-NH2)*	No escuro, o conjugado não influenciou a proliferação da P. gingivalis, porém após irradiação inibiu notavelmente a proliferação do microrganismo.
Liu 2012	<i>Salmonella enterica</i>	Não informado	Proto-Porfirina	AMP Y113WF*	Houve efeito em função da concentração do conjugado e dose de luz irradiada.
Bao 2021	<i>Salmonella enteridis</i>	Não informado	AlEge n AlE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B*	Houve toxicidade escura até certo ponto para esta cepa após a irradiação com luz branca houve uma letalidade bacteriana extremamente alta.
Johnson 2013	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	Eosina Y	(KLAKLAK) 2*	A extensão da fotoinativação do conjugado foi dependente do tempo de irradiação.
Leguerm 2017 ⁵	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B****	O nanocristal de celulose ligado a clorina sozinho, e o nanocristal + clorina + peptídeo tiveram efeito fotobactericida.
Leguerm 2017 ¹	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	Clorina-e6	Polimixina B*	Houve efeito de morte na conjugação do peptídeo + FS (diminuição de 6 unidades logarítmicas) mas só como FS já houve morte igual.
Guo 2022†	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Não informado	AlEgens	HN36(AMP), ditriptofano (W2), poliariginina (R18) e polilisina (K18)*	Todos os conjugados mostraram efeito contra esta cepa após irradiação com excessão do AlE NF+AMP
Bao 2021	<i>Streptococcus mutans</i>	Não informado	AlEge n AlE-DCM (corantes fluorescentes)	Polimixina B*	Nesta cepa, a adição do conjugado sem luz não alterou em nada a sobrevivência. Mesmo após a irradiação, ainda não houve efeito de morte.
Boumé 2010	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Não informado	Porfina	Tat GRKKRRQRRRPPQ*	Após irradiação, o efeito bactericida em todas as espécies foram dependentes da concentração de Tat-porfina.

DISCUSSÃO

Nos dias atuais, a resistência microbiana, trata-se de uma das principais ameaças globais à saúde pública. De fato, a partir da introdução de um novo antibiótico no mercado, a resistência a ele aparece de forma relativamente rápida¹. Segundo a OMS, para o tratamento de infecções microbianas comuns, altas taxas de resistência a antibióticos foram observadas em todo o mundo². O objetivo desta revisão de escopo foi realizar um mapeamento da literatura existente acerca da utilização de peptídeos em associação com a aPDT para eliminação de microrganismos. Ao se concentrar nessas publicações, objetivou-se sintetizar as informações a respeito da eficácia da associação desses tratamentos e as moléculas mais utilizadas, afim de direcionar as pesquisas em função dos tratamentos mais prósperos.

Dos estudos avaliados nesta revisão, a maioria (29) testaram o efeito antimicrobiano da associação sob culturas de *S. aureus*, sendo que 12 testaram o efeito sobre cepas com resistência. Grande parte dessa escolha, foi por conta deste microrganismo se tratar de um modelo de bactéria gram-positiva. Dentre os 29 estudos, aproximadamente 90% identificaram efeito antimicrobiano e acredita-se que a alta susceptibilidade ocorre provavelmente em razão da presença da parede celular de mais fácil permeabilização. A exceção ocorreu nos estudos de Leguern¹ et al.³⁸, Leguern² et al.³⁹ e Jiang et al.³⁴

Bactérias gram-negativas, como *E. coli* (25 estudos), e *P. aeruginosa* (14 estudos) foram as segundas mais estudadas, as quais geralmente possuem menor susceptibilidade aos fotossensibilizadores devido a mudanças na parede celular que dificultam a penetração dos EROs³⁷. Dessa forma, a maioria dos conjugados mostraram maiores efeitos sobre *S. aureus* do que *E. coli*, exceto em Wang et al.⁴⁹, porém o porquê deste desfecho ainda permanece desconhecido⁴⁹. Em alguns peptídeos antimicrobianos essa dificuldade acerca das bactérias Gram-negativas não é encontrada, pois possuem capacidade de atravessar a membrana através de um mecanismo de troca de carga, competindo com íons ligados aos lipopolissacarídeos⁵⁹.

Nesta revisão, foi possível identificar apenas um estudo o qual foi avaliado o uso de peptídeo como fotossensibilizador. Após a irradiação, a eficiência antimicrobiana do peptídeo melhorou em 3,9 ordens de magnitude em comparação com sua atividade no escuro³³. Porém, não são todos os peptídeos que são capazes de obter essa função. Em 2020, Thapa et al.⁵⁸, foi avaliado a fotoestabilidade dos peptídeos GarKS (GakA, GakB e GakC). Foi visto que após a irradiação com luz UVA todos perdem sua atividade antimicrobiana contra culturas de *S. aureus* suscetível e resistente a meticilina.

Os fotossensibilizadores mais utilizados nos estudos foram os macrociclos tetrapirrólicos, as porfirinas e as clorinas respectivamente. Os compostos a base de porfina são encontrados em grande escala na natureza, incluindo nos seres humanos, presentes na hemoglobina, e por esse motivo são considerados fotossensibilizadores promissores para aplicação médica⁵⁷.

CONCLUSÃO

A variedade de fotossensibilizadores associado a peptídeos com finalidade antimicrobiana está ganhando força com o passar dos anos. O número de pesquisas ao redor deste desfecho está aumentando de forma exponencial e se mostra como um forte candidato a tratamento contra microrganismos de interesse médico, inclusive aqueles resistentes a medicamentos oferecidos no mercado farmacêutico. Porém, novas pesquisas ainda precisam ser realizadas afim de elucidar efetivamente o mecanismo de ação dessas terapias em conjunto, além de atingir as melhores combinações entre as moléculas contra os microrganismos ameaçadores da saúde mundial.

Referências

1. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. 2020; 30(4): 619-635. doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004
2. WHO Antimicrobial resistance. 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021 Dec;27:101-111. doi: 10.1016/j.jgar.2021.08.001.
4. Brinkac L, Voorhies A, Gomez A, Nelson KE. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb Ecol*. 2017 Nov;74(4):1001-1008. doi: 10.1007/s00248-017-0985-z.
5. Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem*. 2011; 18(2):256-279.
6. Mwangi J, Hao X, Lai R, Zhang ZY. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool Res*. 2019; 40(6):488-505.
7. Rončević T, Puizina J, Tossi A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in PrePost-Antibiotic Era?. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov; 20(22):5713
8. Rotem S, Mor A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Aug;1788(8):1582-92. doi: 10.1016/j.bbame.2008.10.020.
9. Szeimies, RM. Geschichte der photodynamischen Therapie. *Aktuelle Dermatologie*, 2005 31(05):193-197 doi: 10.1055/s-2005-861104
10. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwing E, Ahmad AA, et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571-589.
11. Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front Microbiol*. 2015 Mar;6:202.
12. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work?. *Photochem Photobiol*. 1992;55(1):145- 157.
13. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):e49-e55.
14. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016;473(4):347-364

15. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):143-166
16. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):468-81.
17. Kashef N, Hamblin MR. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist Updat*. 2017 Mar;31:31-42.
18. Polo L, Segalla A, Bertoloni G, Jori G, Schaffner K, Reddi E. Polylysine-porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens. *J Photochem Photobiol B*. 2000 Dec;59(1-3):152-8. doi: 10.1016/s1011-1344(01)00114-
19. Bao P, Li C, Ou H, Ji S, Chen Y, Gao J, Yue X, Shen J, Ding D. A peptide-based aggregation-induced emission bioprobe for selective detection and photodynamic killing of Gram-negative bacteria. *Biomater Sci*. 2021 Jan 26;9(2):437-442. doi: 10.1039/d0bm01330g
20. Bourré L, Giuntini F, Eggleston IM, Mosse CA, MacRobert AJ, Wilson M. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochem Photobiol Sci*. 2010 Dec;9(12):1613-20. doi: 10.1039/c0pp00146e
21. Cai Q, Fei Y, An HW, Zhao XX, Ma Y, Cong Y, Hu L, Li LL, Wang H. Macrophage-Instructed Intracellular Staphylococcus aureus Killing by Targeting Photodynamic Dimers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Mar 21;10(11):9197-9202. doi: 10.1021/acsami.7b19056
22. Cai, Xiaojun, et al. "Photodynamic and photothermal co-driven CO-enhanced multi-mode synergistic antibacterial nanoplatform to effectively fight against biofilm infections." *Chemical Engineering Journal* 426 (2021): 131919.
23. Chu, Jacky CH, et al. "One-Pot Synthesis of a Cyclic Antimicrobial Peptide-Conjugated Phthalocyanine for Synergistic Chemo-Photodynamic Killing of Multidrug-Resistant Bacteria." *Advanced Therapeutics* 4.3 (2021): 2000204.
24. de Freitas LM, Lorenzón EN, Santos-Filho NA, Zago LHP, Uliana MP, de Oliveira KT, Cilli EM, Fontana CR. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. *Sci Rep*. 2018 Mar 9;8(1):4212. doi: 10.1038/s41598-018-22687-x.
25. de Freitas LM, Lorenzón EN, Cilli EM, de Oliveira KT, Fontana CR, Mang TS. Photodynamic and peptide-based strategy to inhibit Gram-positive bacterial biofilm formation. *Biofouling*. 2019 Aug;35(7):742-757. doi: 10.1080/08927014.2019.1655548
26. Dosselli R, Gobbo M, Bolognini E, Campestri S, Reddi E. Porphyrin-apidaecin conjugate as a new broad spectrum antibacterial agent. *ACS Med Chem Lett*. 2010 Feb 1;1(1):35-8. doi: 10.1021/ml900021y
27. Dosselli R, Tampieri C, Ruiz-González R, De Munari S, Ragàs X, Sánchez-García D, Agut M, Nonell S, Reddi E, Gobbo M. Synthesis, characterization, and photoinduced antibacterial activity of porphyrin-type photosensitizers conjugated to the antimicrobial peptide apidaecin 1b. *J Med Chem*. 2013 Feb 14;56(3):1052-63. doi: 10.1021/jm301509n
28. Dosselli R, Ruiz-González R, Moret F, Agnolón V, Compagnin C, Mognato M, Sella V, Agut M, Nonell S, Gobbo M, Reddi E. Synthesis, spectroscopic, and photophysical characterization and photosensitizing activity toward prokaryotic and eukaryotic cells of porphyrin-magainin and -butorin conjugates. *J Med Chem*. 2014 Feb 27;57(4):1403-15. doi: 10.1021/jm401653r
29. Feese, Elke, et al. "Towards microbe-targeted photosensitizers: Synthesis, characterization and in vitro photodynamic inactivation of the tuberculosis model pathogen *M. smegmatis* by porphyrin-peptide conjugates." *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 23.11n12 (2019): 1414-1439.
30. Gao Y, Wang J, Hu D, Deng Y, Chen T, Jin Q, Ji J. Bacteria-Targeted Supramolecular Photosensitizer Delivery Vehicles for Photodynamic Ablation Against Biofilms. *Macromol Rapid Commun*. 2019 Feb;40(4):e1800763. doi: 10.1002/marc.201800763

31. Gao, Qiang, et al. "Chlorin e6 (Ce6)-loaded supramolecular polypeptide micelles with enhanced photodynamic therapy effect against *Pseudomonas aeruginosa*." *Chemical Engineering Journal* 417 (2021): 129334.
32. Han H, Gao Y, Chai M, Zhang X, Liu S, Huang Y, Jin Q, Grzybowski A, Ji J, Yao K. Biofilm microenvironment activated supramolecular nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bacterial keratitis. *J Control Release*. 2020 Nov 10;327:676-687. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.09.014
33. Jiang Q, E F, Tian J, Yang J, Zhang J, Cheng Y. Light-Excited Antibiotics for Potentiating Bacterial Killing via Reactive Oxygen Species Generation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Apr 8;12(14):16150-16158. doi: 10.1021/acsami.0c02647
34. Jiang Q, Yan X, Jiao D, Zhang J, Wu Y, Cheng Y. Polymyxin B-modified conjugated oligomer nanoparticle for targeted identification and enhanced photodynamic antimicrobial therapy. *Chem Commun (Camb)*. 2021 Oct 26;57(85):11244-11247. doi: 10.1039/d1cc04389g
35. Johnson GA, Muthukrishnan N, Pellois JP. Photoinactivation of Gram positive and Gram negative bacteria with the antimicrobial peptide (KLAKLAK)(2) conjugated to the hydrophilic photosensitizer eosin Y. *Bioconjug Chem*. 2013 Jan 16;24(1):114-23. doi: 10.1021/bc3005254
36. Johnson GA, Ellis EA, Kim H, Muthukrishnan N, Snavely T, Pellois JP. Photoinduced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK)2. *PLoS One*. 2014 Mar 7;9(3):e91220. doi: 10.1371/journal.pone.0091220
37. Judzewitsch PR, Corrigan N, Wong EHH, Boyer C. Photo-Enhanced Antimicrobial Activity of Polymers Containing an Embedded Photosensitizer. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021 Nov 2;60(45):24248-24256. doi: 10.1002/anie.202110672
38. Le Guern F¹, Sol V, Ouk C, Arnoux P, Frochot C, Ouk TS. Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin following the Attachment of Polymyxin B. *Bioconjug Chem*. 2017 Sep 20;28(9):2493-2506. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
39. Le Guern F², Ouk TS, Ouk C, Vanderesse R, Champavier Y, Pinault E, Sol V. Lysine Analogue of Polymyxin B as a Significant Opportunity for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *ACS Med Chem Lett*. 2017 Oct 17;9(1):11-16. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00360
40. Le Guern F³, Ouk TS, Grenier K, Joly N, Lequart V, Sol V. Enhancement of photobactericidal activity of chlorin-e6-cellulose nanocrystals by covalent attachment of polymyxin B. *J Mater Chem B*. 2017 Sep 7;5(33):6953-6962. doi: 10.1039/c7tb01274h
41. Lei X, Qiu L, Lan M, Du X, Zhou S, Cui P, Zheng R, Jiang P, Wang J, Xia J. Antibacterial photodynamic peptides for staphylococcal skin infection. *Biomater Sci*. 2020 Dec 7;8(23):6695-6702. doi: 10.1039/d0bm01467b
42. Li Z, Pan W, Shi E, Bai L, Liu H, Li C, Wang Y, Deng J, Wang Y. A Multifunctional Nanosystem Based on Bacterial Cell-Penetrating Photosensitizer for Fighting Periodontitis Via Combining Photodynamic and Antibiotic Therapies. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Feb 8;7(2):772-786. doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01638
43. Liu F, Soh Yan Ni A, Lim Y, Mohanram H, Bhattacharjya S, Xing B. Lipopolysaccharide neutralizing peptide-porphyrin conjugates for effective photoinactivation and intracellular imaging of gram-negative bacteria strains. *Bioconjug Chem*. 2012 Aug 15;23(8):1639-47. doi: 10.1021/bc300203d
44. Nakonieczna J, Wolnikowska K, Ogonowska P, Neubauer D, Bernat A, Kamysz W. Rose Bengal-Mediated Photoinactivation of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Is Enhanced in the Presence of Antimicrobial Peptides. *Front Microbiol*. 2018 Aug 20;9:1949. doi: 10.3389/fmicb.2018.01949
45. Pierce S, Jennings MP, Juliano SA, Angeles-Boza AM. Peptide-Ruthenium Conjugate as an Efficient Photosensitizer for the Inactivation of Multidrug-Resistant Bacteria. *Inorg Chem*. 2020 Oct 19;59(20):14866-14870. doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c02491

46. Qiu L, Wang C, Lei X, Du X, Guo Q, Zhou S, Cui P, Hong T, Jiang P, Wang J, Li YQ, Xia J. Gelatinase-responsive release of an antibacterial photodynamic peptide against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Sci*. 2021 May 4;9(9):3433-3444. doi: 10.1039/d0bm02201b
47. Qiu L, Wang C, Lan M, Guo Q, Du X, Zhou S, Cui P, Hong T, Jiang P, Wang J, Xia J. Antibacterial Photodynamic Gold Nanoparticles for Skin Infection. *ACS Appl Bio Mater*. 2021 Apr 19;4(4):3124-3132. doi: 10.1021/acsabm.0c01505
48. Vince RV, Madden LA, Alonso CM, Savoie H, Boyle RW, Todman M, Paget T, Greenman J. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-specific peptides for targeted photoantimicrobial chemotherapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 Apr;10(4):515-22. doi: 10.1039/c0pp00267d
49. Wang X, Qiu L, Wang C, Gao Z, Zhou S, Cui P, Jiang P, Hu H, Ni X, Du X, Wang J, Xia J. Nanodot-doped peptide hydrogels for antibacterial phototherapy and wound healing. *Biomater Sci*. 2022 Feb 1;10(3):654-664. doi: 10.1039/d1bm01533h
50. Yang K, Gitter B, Rüger R, Wieland GD, Chen M, Liu X, Albrecht V, Fahr A. Antimicrobial peptide-modified liposomes for bacteria targeted delivery of temoporfin in photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 Oct;10(10):1593-601. doi: 10.1039/c1pp05100h
51. Zhang Y , Zhang H , Zou Q , Xing R , Jiao T , Yan X . An injectable dipeptide-fullerene supramolecular hydrogel for photodynamic antibacterial therapy. *J Mater Chem B*. 2018 Nov 28;6(44):7335-7342. doi: 10.1039/c8tb01487f
52. Zhang AN, Wu W, Zhang C, Wang QY, Zhuang ZN, Cheng H, Zhang XZ. A versatile bacterial membrane-binding chimeric peptide with enhanced photodynamic antimicrobial activity. *J Mater Chem B*. 2019 Feb 21;7(7):1087-1095. doi: 10.1039/c8tb03094d
53. Zhang D, Chen J, Jing Q, Chen Z, Ullah A, Jiang L, Zheng K, Yuan C, Huang M. Development of a Potent Antimicrobial Peptide With Photodynamic Activity. *Front Microbiol*. 2021 Jun 1;12:624465. doi: 10.3389/fmicb.2021.624465
54. Zhao, Yang, et al. "A novel silicon (IV) phthalocyanine-oligopeptide conjugate as a highly efficient photosensitizer for photodynamic antimicrobial therapy." *Dyes and Pigments* 172 (2020): 107834.
55. Zhou F, Lin S, Zhang J, Kong Z, Tan BK, Hamzah SS, Hu J. Enhancement of photodynamic bactericidal activity of curcumin against *Pseudomonas Aeruginosa* using polymyxin B. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Mar;37:102677. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102677
56. Guo K, Zhang M, Cai J, Ma Z, Fang Z, Zhou H, Chen J, Gao M, Wang L. Peptide-Engineered AIE Nanofibers with Excellent and Precisely Adjustable Antibacterial Activity. *Small*. 2022 Apr;18(17):e2108030. doi: 10.1002/smll.202108030
57. Jiang L, Gan CR, Gao J, Loh XJ. A Perspective on the Trends and Challenges Facing Porphyrin-Based Anti-Microbial Materials. *Small*. 2016 Jul;12(27):3609-44. doi: 10.1002/smll.201600327.
58. Thapa RK, Winther-Larsen HC, Diep DB, Tønnesen HH. Photostability studies of GarKS peptides for topical formulation development. *Eur J Pharm Sci*. 2021 Mar 1;158:105652. doi: 10.1016/j.ejps.2020
59. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res*. 2017 Mar;96(3):254-260. doi: 10.1177/0022034516679973.

APÊNDICE C – SUMÁRIO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA UTILIZADAS NAS ANÁLISES DOS DADOS

Tabela 1 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 90028 na condição controle PDI (sem luz) em células planctônicas

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	0.406	6	0.068	0.700	0.650	0.036	0.268
Melitina	1.430	3	0.477	4.929	0.003	0.118	0.902
Curcumina x Melitina	0.335	18	0.019	0.192	1.000	0.030	0.133
Resíduo	10.732	111	0.097				
TOTAL	5633.001	139					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 96901 na condição controle PDI (sem luz) em células planctônicas

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	1.656	6	0.276	0.613	0.719	0.033	0.236
Melitina	0.189	3	0.063	0.140	0.936	0.004	0.075
Curcumina x Melitina	6.376	18	0.354	0.787	0.711	0.115	0.534
Resíduo	49.048	109	0.450				
TOTAL	5333.321	137					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 90028 após iluminação LED em células planctônicas

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	740.936	6	123.489	198.552	0.000	0.914	1.000
Melitina	10.354	3	3.451	5.549	0.001	0.129	0.935
Curcumina x Melitina	14.940	18	0.830	1.335	0.180	0.177	0.827
Resíduo	69.658	112	0.622				
TOTAL	1354.868	140					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 96901 após iluminação LED em células planctônicas

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	289.241	6	48.207	23.063	0.000	0.553	1.000
Melitina	20.380	3	6.793	3.250	0.025	0.080	0.733
Curcumina x Melitina	19.390	18	1.077	0.515	0.946	0.076	0.342
Resíduo	234.105	112	2.090				
TOTAL	2765.884	140					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 90028 na condição controle PDI (sem luz) em biofilme

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	0.177	3	0.059	0.825	0.490	0.072	0.208
Melitina	0.025	1	0.025	0.350	0.558	0.011	0.089
Curcumina x Melitina	0.205	3	0.068	0.955	0.426	0.082	0.236
Resíduo	2.293	32	0.072				
TOTAL	1643.601	40					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 96901 na condição controle PDI (sem luz) em biofilme

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	0.266	3	0.089	0.718	0.548	0.063	0.185
Melitina	0.078	1	0.078	0.629	0.433	0.019	0.120
Curcumina x Melitina	0.274	3	0.091	0.738	0.537	0.065	0.189
Resíduo	3.956	32	0.072				
TOTAL	1784.266	40					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 90028 após iluminação com luz LED em biofilme

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	0.638	3	0.213	1.378	0.267	0.114	0.331
Melitina	2.657	1	2.657	17.208	0.000	0.350	0.980
Curcumina x Melitina	0.201	3	0.067	0.434	0.730	0.039	0.127
Resíduo	4.942	32	0.154				
TOTAL	1400.013	40					

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 - Sumário da Análise de Variância a dois fatores realizada para os dados obtidos com a cepa *C. albicans* ATCC 96901 após iluminação com luz LED em biofilme

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η^2_p	Poder
Curcumina	1.546	3	0.515	1.449	0.247	0.120	0.346
Melitina	1.204	1	1.204	3.385	0.075	0.096	0.430
Curcumina x Melitina	0.358	3	0.119	0.336	0.799	0.031	0.108
Resíduo	11.384	32	0.356				
TOTAL	1692.313	40					

Fonte: Elaboração própria.

ANEXO A: TERMO DE DOAÇÃO DE CEPAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *C. albicans***TERMO DE DOAÇÃO**

Eu Dra. Juliana Campos Junqueira, professora Associada do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) de São José dos Campos - UNESP, localizada na Avenida Engenheiro Francisco José Longo, 777 - Jardim São Dimas, São José dos Campos - SP, portadora dos documentos RG 24.562.534-3 e CPF 199.114.128-90 estou doando à Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina, Profa. do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP duas cepas da espécie do microrganismo *Candida albicans* (CA 14 E CA 70) possibilitando a realização do projeto de pesquisa "Avaliação da eficácia da DNase associada a terapia fotodinâmica na inativação de biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* resistentes a fluconazol".

Declaro ainda que as cepas de *Candida albicans* por mim doadas poderão ser utilizadas para a realização de outras pesquisas que a Profa. Ana Cláudia julgar necessário.

São José dos Campos, 05 de agosto de 2020

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Campos Junqueira", written over a horizontal line.

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira
Disciplina de Microbiologia e Imunologia
Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO PARA USO DE CEPAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *C. albicans*

25/03/2021

E-mail de Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Cepas de Candida doadas à FOAr



Livia Nordi Dovigo <livia.dovigo@unesp.br>

Cepas de Candida doadas à FOAr

3 mensagens

Livia Nordi Dovigo <livia.dovigo@unesp.br>

24 de março de 2021 17:06

Para: Juliana Campos Junqueira <juliana.junqueira@unesp.br>, Ana Claudia Pavarina <ana.pavarina@unesp.br>

Prezada Profa. Juliana, como vai? Espero que este email a encontre bem e com saúde.

Estou entrando em contato pois atuo junto ao laboratório de pesquisa da Profa. Ana Cláudia Pavarina e tenho uma proposta de pesquisa que necessita utilizar cepas de Candida com resistência a fluconazol. A professora Ana Cláudia me informou que recebeu a doação de duas cepas (CA 14 E CA 70) provenientes de seu laboratório para um estudo anterior e essas cepas também se encaixam no objetivo do trabalho sob minha orientação. Verificamos que o termo de doação autoriza a utilização dessas cepas em outras pesquisas, mas, mesmo assim, gostaríamos de confirmar essa autorização antes da pesquisa ser iniciada. A professora Ana Cláudia nos lê em cópia para acompanhamento.

Agradeço desde já,

Atenciosamente,

--

Prof^a. Dr^a. Livia Nordi Dovigo

Assistant Professor - Biostatistics

Araraquara Dental School, Univ Estadual Paulista - UNESP

Department of Social Dentistry

www.foar.unesp.br

"We need less research, better research, and research done for the right reasons" DG Altman

Juliana Campos Junqueira <juliana.junqueira@unesp.br>

24 de março de 2021 18:55

Para: Livia Nordi Dovigo <livia.dovigo@unesp.br>

Cc: Ana Claudia Pavarina <ana.pavarina@unesp.br>

Oi Livia e Ana Claudia

Sim, claro. Pode usar as cepas em outros trabalhos.

Abs

Juliana

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São Paulo State University - ICT/UNESP

Web of Science Publons: <https://publons.com/researcher/2960185/juliana-campos-junqueira/>

Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?hl=pt&user=30jyjacAAAAJ>

Curriculum: <http://lattes.cnpq.br/0322020541055900>

São Paulo Research Foundation/Fapesp: <https://bv.fapesp.br/pt/pesquisador/9035/>

[Texto das mensagens anteriores oculto]

Livia Nordi Dovigo <livia.dovigo@unesp.br>

25 de março de 2021 09:27

Para: Juliana Campos Junqueira <juliana.junqueira@unesp.br>

Cc: Ana Claudia Pavarina <ana.pavarina@unesp.br>

Obrigada!

Abs!

[Texto das mensagens anteriores oculto]

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 8 de Junho de 2022.

Nathália dos Santos Fusco