

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

JOSÉ ALEXANDRE DA SILVA JÚNIOR

**SÍNTESES, FOTOFÍSICA E ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE MCHC-CLORINA EM
*CANDIDA ALBICANS***

TESE DE DOUTORADO

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, junho/2023

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

JOSÉ ALEXANDRE DA SILVA JÚNIOR

**SÍNTESES, FOTOFÍSICA E ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE MCHC-CLORINA EM
*CANDIDA ALBICANS***

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

Coorientadora: Profa. Dra. Eveleise Samira Martins Canto

São José dos Campos, junho/2023

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58s Silva Júnior, José Alexandre da
Sínteses, fotofísica e atividade fotodinâmica de MCHC-Clorina em
Candida albicans / José Alexandre da Silva Júnior – 2023.
93f; 30 cm.

Orientador: Adjaci Uchoa Fernandes.
Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Universidade
Anhembí Morumbi, São José dos Campos, 2023.
Bibliografia: f. 75-93.

1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Clorina.
4. Laser. 5. Candida albicans. I. Título.

CDD 610.28

DECICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que me acompanhou em todos os momentos da minha vida, dando apoio e incentivo nos bons e maus momentos.

À minha mãe Marilúcia Campos, que não mediu esforços para que eu tivesse acesso à melhor educação, contribuindo substancialmente na construção do meu caráter.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celeste, Deus, a Quem devo todos os agradecimentos por todas as vitórias conquistadas e derrotas que me fizeram dar valor a tudo que tenho.

Às minhas irmãs Alessandra Campos da Silva e Joseandra Aparecida Campos da Silva por dividirem comigo experiências em família que apenas irmãos são capazes de vivenciar.

À Universidade Anhembi Morumbi, pelo primor do programa de Engenharia Biomédica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo incentivo financeiro.

Aos meus amigos Andreia, Audiel e Nathália, por toda a hospitalidade e o apoio oferecido; e aos meus amigos Elzo, Jeyse, Henrique e João, pelo companheirismo, incentivo e amizade sincera.

Ao professor Adjaci Uchôa, pelas orientações e dedicação na conclusão desta pesquisa.

À professora Eveleise Martins e aos técnicos do laboratório da UFOPA pela viabilidade da pesquisa e pela ajuda durante a coleta de dados.

RESUMO

Título: Sínteses, fotofísica e atividade fotodinâmica de MCHC-clorina em *Candida albicans*.

As Candidíases são a causa mais frequente de infecções fúngicas humanas, sendo que a *Candida albicans*, a espécie mais prevalente, em determinadas condições, torna-se patogênica, aparecendo associada a várias situações patológicas. O elevado crescimento do número de infecções fúngicas vem aumentando o interesse por terapias alternativas e complementares que objetivam a ação fungicida ou fungistática, como a Terapia Fotodinâmica (TFD). Diante disso, objetivou-se verificar os fatores envolvidos na ação fotodinâmica *in vitro* sobre leveduras de *Candida albicans*, utilizando o fotossensibilizador MCHC-Clorina. Foram reativadas cepas de *C. albicans* ATCC 60196 e realizada a preparação do inóculo fúngico de acordo com a escala de McFarland nº 0,5. Realizou-se diluições seriadas até 10^{-3} mL em solução salina a 0,5%. Posteriormente o inóculo foi cultivado em solução derivada de clorina, MCHC-Clorina na concentração de $5,6\mu\text{mol}$. Como fonte de luz foi utilizado um equipamento diodo laser de 660nm, potência de 50mW, emissão de $0,04\text{cm}^2$ em dose de 100J. As amostras foram divididas em diferentes grupos, onde os grupos 1, 2 e 6 eram controles, e 3, 4 e 5, grupos testes, sendo este último, o grupo de estudo da ação fotodinâmica. No grupo 1 não houve crescimento fúngico e, no grupo 2, houve crescimento do microrganismo. Nos grupos 3 e 4 ($p < 0,0001$), que receberam a terapia de forma incompleta, percebeu-se uma manutenção do crescimento de UFC's. No grupo 5, grupo que recebeu a Terapia Fotodinâmica (TFD), houve total redução do fungo a partir do 15º minuto de irradiação com luz laser. No grupo 6 ($p = 0,507$) que testou a ação do fármaco Anfotericina B, percebeu-se redução das UFC's, mas sem diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo 5. Diante dos resultados expostos pode-se inferir que a Terapia Fotodinâmica com uso do MCHC-Clorina na concentração de $5,6\mu\text{mol}$, é eficaz na redução *in vitro* do fungo *Candida albicans*.

Palavras-chaves: Terapia fotodinâmica. Clorina. Laser. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Title: Synthesis, photophysics and photodynamic activity of MCHC-chlorin in *Candida albicans*.

Candidiasis are the most frequent cause of human fungal infections, and *Candida albicans*, the most prevalent species, under certain conditions, becomes pathogenic, appearing associated with various pathological situations. The high growth in the number of fungal infections has increased the interest in alternative and complementary therapies that aim at fungicidal or fungistatic action, such as Photodynamic Therapy (PDT). In view of this, the objective was to verify the factors involved in the *in vitro* photodynamic action on *Candida albicans* yeasts, using the photosensitizer MCHC-Chlorin. *C. albicans* ATCC 60196 strains were reactivated, and fungal inoculum was prepared according to the McFarland scale 0.5. Serial dilutions were made up to 10^{-3} mL in 0.5% saline solution. Afterwards, the inoculum was cultivated in chlorin-derived solution, MCHC-Chlorin at a concentration of 5,6 μ mol. As light source it was used a laser diode equipment of 660nm, power of 50mW, emission of 0.04 cm² in dose of 100J. The samples were divided into different groups, where groups 1, 2 and 6 were controls, and 3, 4 and 5, test groups, being the latter, the study group of photodynamic action. In group 1 there was no fungal growth and in group 2 there was growth of the microorganism. In groups 3 and 4 ($p < 0.0001$), which received the therapy incompletely, perceived a maintenance of CFU growth. In group 5, a group that received Photodynamic Therapy (PDT), there was a total reduction of the fungus from the 15th minute of laser irradiation. In group 6 ($p = 0.507$) that tested the action of the drug Amphotericin B, there was a reduction of the CFU, but without statistically significant difference when compared with group 5. Given the exposed results it can be inferred that the Photodynamic Therapy with the use of MCHC-Chlorin at the concentration of 5,6 μ mol is effective in reducing *in vitro* the fungus *Candida albicans*.

Keywords: Photodynamic therapy. Chlorin. Laser. *Candida albicans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	<i>Candida albicans</i> em forma de levedura	19
Figura 2.	Polimorfismo da <i>Candida albicans</i>	22
Figura 3.	Candidíase pseudomembranosa	27
Figura 4.	Candidíase eritematosa aguda	28
Figura 5.	Candidíase eritematosa crônica	28
Figura 6.	Candidíase hiperplásica	29
Figura 7.	Candidíase esofágica	31
Figura 8.	Dermatite de fraldas por <i>C. albicans</i> – assaduras	35
Figura 9.	Diagrama de Jablonski simplificado	43
Figura 10.	Projeção de raio-x para o composto	46
Figura 11.	Sistema Diodo Laser, modelo PLD-1/50	49
Figura 12.	Esquema para obtenção de fenilmaleimida	55
Figura 13.	Rota de obtenção da MCHC-Clorina A e B	55
Figura 14.	Espectros de RNM em CDCl ₃ para o composto [13A]	56
Figura 15.	Espectros de RNM em CDCl ₃ para o composto [13B]	57
Figura 16.	Microscopia de fluorescência de <i>C. albicans</i>	63
Figura 17.	Grupo controle 1 (meio TSB + clorina)	63
Figura 18.	Grupo controle 2 (meio TSB + <i>C. albicans</i>)	64
Figura 19.	Grupo 3 (meio TSB + Clorina + <i>C. albicans</i>)	64
Figura 20.	Grupo 4 (meio TSB + <i>C. albicans</i> + Laser)	65
Figura 21.	Grupo 5 (meio TSB + <i>C. albicans</i> + Clorina + Laser)	65
Figura 22.	Grupo controle 6 (meio TSB + <i>C. albicans</i> + Anfotericina B)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição das amostras divididas nos respectivos grupos experimentais.....	53
Tabela 2.	Comparação entre as médias em Log (UFC/mL) dos 2 grupos experimentais utilizados nos ensaios com fungo <i>C. albicans</i> e o grupo controle positivo em relação ao grupo 5.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Espectro por UV-Vis da MCHC-Clorina	58
Gráfico 2.	Espectro de emissão fluorescente da MCHC-Clorina	58
Gráfico 3.	Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ do composto 13A	59
Gráfico 4.	Transiente de decaimento de $^1\text{O}_2$ da clorina A	60
Gráfico 5.	Rendimento quântico de $^1\text{O}_2$	60
Gráfico 6.	Coeficiente de partição de 1-octanol/água das clorinas A e B	62
Gráfico 7.	Representação gráfica da distribuição dos resultados logarítmicos de UFC/mL segundo os grupos experimentais.	67
Gráfico 8.	Representação gráfica da distribuição dos resultados logarítmicos de UFC/mL segundo os grupos experimentais em função do tempo de exposição ao laser e do grupo controle 6.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
Å	Ângstrom
AgNPs	Nanopartículas de prata
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
Anf B	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
C.	<i>Candida</i>
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CEI	Células epiteliais intestinais
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro ao quadrado
CMC	Candidíase mucocutânea crônica
DII	Doença inflamatória intestinal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIB	Erosio interdigitalis blastomycetica
EMA	European Medicines Agency
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
Fs	Fotossensibilizador
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HIES	Hiperimunoglobulina E
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IL	Interleucina
J	Joule
KMnO_4	Permanganato de potássio
LED	Diodo Emissor de Luz
Log	Logaritmo

M	Molar
MCHC	Monomeric Chlorin at High Concentration (Clorina Monomérica em Alta Concentração)
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mJ	Milijoule
mL	Mililitro
mW	Miliwatt
Nd-YAG	Neodímio - Ítrio Alumínio Granada
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundo
°C	Grau centígrado
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
SDA	Ágar Sabouraud-Dextrose
spp	Espécies
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TCL	Teoria do Campo Ligante
TLC	Cromatografia em Camada Fina
TFD	Terapia Fotodinâmica
TNF α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TSB	Triptecaseína de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta – visível
β	Beta
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
	2.1. Características gerais da <i>Candida albicans</i>	18
	2.2. Parede celular da <i>Candida albicans</i>	19
	2.3. Fatores de virulência da <i>Candida albicans</i>	20
	2.3.1 Aderência	21
	2.3.2 Polimorfismo	21
	2.3.3 Variabilidade fenotípica	22
	2.3.4 Produção de exoenzimas	23
	2.3.5 Produção de toxinas	23
	2.4. Produção de biofilme por <i>Candida albicans</i>	23
	2.4.1 Biofilme como fator de virulência	25
	2.5. Manifestações clínicas da Candidíase	25
	2.5.1 <i>Candida albicans</i> na cavidade oral	26
	2.5.2 <i>Candida albicans</i> em Gastroenterologia	30
	2.5.3 <i>Candida albicans</i> em Dermatovenerologia	33
	2.5.4 Infecções invasivas por <i>Candida albicans</i>	37
	2.6. Terapia Fotodinâmica	41
	2.6.1 Mecanismos de ação	42
	2.6.2 Fotossensibilizadores	44
	2.6.3 MCHC-Clorina	45
3	OBJETIVOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODO	48
	4.1 Equipamentos e metodologias aplicadas	48
	4.2 Síntese	50
	4.3 Caracterização estrutural	50
	4.4 Partição 1-octanol/água	52
	4.5 Internalização do fotossensibilizador	52
	4.6 Cultivo e suspensão de <i>Candida albicans</i>	52
	4.7 Estudos da ação fotodinâmica	53

4.8 Tratamento dos dados	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Síntese de dienófilos (maleimidas)	55
5.2 Obtenção da fenilclorinas	55
5.3 Propriedades físicas e fotofísicas	58
5.3.1 Espectros Uv-Vis e emissão fluorescente	58
5.3.2 Emissão de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)	59
5.3.3 Partição 1-octanol/água	61
5.3.4 Internalização do fotossensibilizador	62
5.4 Testes de esterilidade, viabilidade e da ação fotodinâmica	63
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

As Candidíases (*Candida* spp) são as infecções fúngicas humanas mais frequentes, sendo que a *Candida albicans*, a espécie mais prevalente, em determinadas condições, torna-se patogênica, aparecendo associada a várias situações patológicas. A colonização de diferentes tecidos por *Candida* spp pode levar a uma infecção facilitada pela proliferação do microrganismo. Como consequências desta proliferação, as repercussões podem variar desde candidíase localizada benigna até infecções sistêmicas letais. A alta biodiversidade fenotípica de *Candida* spp e alteração do sistema imunológico do hospedeiro subjacente ao comportamento variável deste patógeno oportunista pode resultar numa amplificação das propriedades invasivas (SIMÕES et al., 2013).

As manifestações clínicas na candidíase apresentam grande diversidade, que vão desde candidíase mucocutânea até candidíase invasiva ou sistêmica. A candidíase mucocutânea consiste em manifestações superficiais, apresentando as seguintes formas: candidíase intertriginosa, onicomicose, candidíase oral, vulvovaginite, balanopostite e candidíase mucocutânea crônica. Já a candidíase invasiva ou sistêmica caracteriza-se por apresentar infecções profundas ou invasivas, podendo localizar-se em um órgão ou disseminar-se via sanguínea (candidemia). Manifestam-se através de sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, renal, ocular, do sistema nervoso central, ou disseminada, que é uma forma clínica de difícil tratamento (DIGNANI et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Sobre as drogas antifúngicas utilizadas no tratamento convencional das candidíases, sabe-se que exercem ações fungistáticas ou fungicidas, direta ou indiretamente. Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), existindo também os que atuam sobre a síntese dos ácidos nucleicos como fluocitosina e a griseofulvina (LACAZ; NEGRO, 1991).

Quanto aos antifúngicos sistêmicos existentes, os mais comuns são a anfotericina B e os derivados azólicos, na qual a ação fungistática (neutralização do fungo) ou fungicida (morte celular) é dependente da concentração da droga. O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade

e a manutenção da função da membrana celular dos fungos, acarretando alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes e, conseqüentemente, inibindo o crescimento fúngico (NOBRE et al., 2002).

A anfotericina B é indicada para formas graves de doença invasiva, pertencendo ao grupo dos poliênicos. São grandes moléculas que atuam na membrana celular fúngica, onde possui grande afeição pelo ergosterol, justificando sua especificidade (RANG et al., 2011; CHUDZIK et al., 2015). No entanto, a anfotericina B está sendo cada vez menos utilizada porque sua administração intravenosa oferece algum nível de toxicidade renal, cardiovascular, neurológica e gastrointestinal. Em casos de candidíase sistêmica grave por disseminação de *Candida*, foi descrita na literatura, resistência à anfotericina B. Destarte, os fármacos de primeira escolha quando se opta por um antifúngico sistêmico, são derivados azólicos como o itraconazol e o fluconazol, ambos administrados por via oral, uma vez que apresentam poucos efeitos colaterais, sendo considerados seguros e eficazes (SIMÕES et al., 2013).

Com o aumento da frequência de uso de fluconazol, muito utilizado na profilaxia de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos, foram relatados casos de resistência a diferentes cepas de *Candida*, além de *C. cruzi* e *C. glabrata* (SIMÕES et al., 2013). Desse modo, o elevado crescimento do número de infecções fúngicas vem aumentando o interesse por terapias alternativas e complementares que objetivam a ação fungicida ou fungistática. Por este motivo a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem atraído o interesse científico por se tratar de uma técnica não invasiva e pelas suas propriedades microbicidas e cicatrizantes (PERUSSI, 2007).

Este método combina um fotossensibilizador (Fs) não tóxico com luz visível, em comprimento de onda adequado, para excitar o Fs ao seu estado tripleto reativo. Este, por sua vez, resulta em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como oxigênio singleto (1O_2) e superóxido, considerados tóxicos para as células, causando a morte do microrganismo que se encontra ligado ao Fs (PERUSSI, 2007).

Atualmente, muitos Fs estão sendo testados e utilizados como agentes antimicrobianos. Os fotossensibilizadores são classificados em duas gerações. A 2ª geração, como exemplo, as clorinas, surgiu para tentar amenizar alguns problemas que a 1ª geração apresentava como: prolongada sensibilidade cutânea, baixa seletividade pelo tecido tumoral e a banda de absorção fraca onde a droga é fotoativada, não se encontrando na região ideal do espectro, região do vermelho (RIBEIRO et al., 2007).

Nos últimos anos, a TFD tem sido proposta como um tratamento alternativo para infecções bacterianas e fúngicas localizadas, as quais são resistentes aos antibióticos convencionais (TEGOS et al., 2008; ROSA et al., 2015). A TFD, originalmente aplicada no tratamento de alguns tipos de câncer de pele, tem se desenvolvido no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, caracterizando-se como uma importante terapêutica na inativação de vários microrganismos patogênicos, incluindo isolados clínicos resistentes às drogas (COSTA et al., 2011). A resistência microbiana aos antifúngicos é um fenômeno em crescimento, o que faz da TFD uma ferramenta promissora, uma vez que ela induz danos na membrana, no DNA e nas mitocôndrias (DONNELLY et al., 2008; MIMA et al., 2012). Constitui, assim, uma modalidade terapêutica alternativa no tratamento de processos infecciosos, muitos dos quais são resistentes ao tratamento convencional.

Devido à sua grande relevância na atualidade, as Candidíases são motivo de grande preocupação para órgãos públicos de saúde em todo o mundo. Há uma crescente preocupação em desenvolver pesquisas que tragam maiores possibilidades terapêuticas no tratamento das mais variadas formas de manifestações patológicas do fungo *Candida albicans*. Por esta razão, buscou-se estudar a eficácia da terapia fotodinâmica utilizando um novo fotossensibilizador derivado de clorina, a MCHC-Clorina, como uma alternativa de tratamento que não promova resistência do microrganismo, minimizando as chances de recidivas. Nesse sentido verificar a ação fotodinâmica e alguns fatores envolvidos, frente à *Candida albicans*, utilizando-se o fotossensibilizador MCHC-Clorina, denota-se como algo relevante na busca de opções terapêuticas no tratamento das Candidíases.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais da *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos eucarióticos desprovidos de pigmentos fotossintetizantes que possuem parede celular composta basicamente por quitina e membrana plasmática fosfolipídica que contém vários esteróis, com predomínio do ergosterol. A nutrição é feita a partir de fontes de carbono absorvidas do ambiente, já que a sua parede celular é rígida e não permite a realização da fagocitose (AGUIAR, 2007). Do ponto de vista taxonômico, cerca de 200 espécies de *Candida* estão descritas pertencentes ao Reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes* e Família *Cryptococcaceae*, embora algumas espécies estejam agrupadas na subdivisão *Ascomycotina* (MALUCHE; SANTOS, 2008; RIBEIRO, 2008).

Apenas 10% destas leveduras são reconhecidas como agentes etiológicos em infecções humanas, que geralmente são caracterizadas como oportunistas comensais da superfície de mucosas e pele de seres humanos e de outros animais (ALLE; RENDE; OKUR, 2010). Cerca de 20 a 50% da população carrega *Candida* na cavidade bucal. A espécie *C. albicans* representa 60 a 90% dos isolados, *C. tropicalis* cerca de 7%, outras espécies como *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são evidenciadas em menor frequência (MAGDALENA; PERRONE, 2001; LACAZ; NEGRO, 1991; MARTINS et al., 2002; RIBEIRO, 2002; SCHERMA, 2004; URIZAR, 2002).

Candida albicans é a espécie de maior relevância em função da sua prevalência tanto em hospedeiros hígidos como aqueles com alguma alteração de base ou comprometimento imunitário (VALLE; RENDE; OKURA, 2010; BARBEDO; SGARBI, 2010; SUZUKI, 2009). Esta levedura está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, ao contrário de outras espécies do gênero de distribuição limitada (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Considerando aspectos microbiológicos, a *Candida albicans* (figura 1) é caracterizada primariamente pela morfologia colonial úmida, cremosa e com odor específico, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada em meio de cultura Ágar Sabouraud, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa. Seu crescimento é favorecido em temperaturas variando entre 20°C e 38°C. O pH ácido favorece sua proliferação sendo que a faixa ideal de pH varia de 2,5 até 7,5. Microscopicamente as células leveduriformes são de formato esférico, ovoide ou alongado,

medem de 3 a 5µm de diâmetro e apresentam-se como gram-positivas em preparações coradas por esta técnica (RIBEIRO, 2008; ANDRADE, 2006; BARBIERI, 2005).

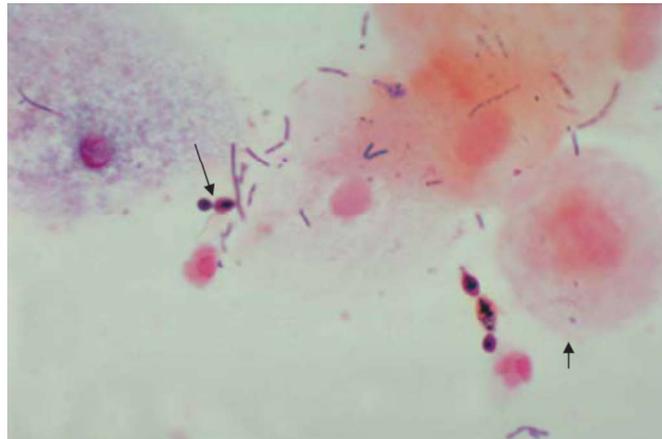


Figura 1 – *Candida albicans* em forma de levedura. A seta longa indica levedura com brotamento. A seta curta indica a membrana externa de uma célula epitelial vaginal. Na coloração de Gram de uma amostra, diferentes bactérias que fazem parte da microbiota normal da vagina podem ser observadas.

Fonte: Levinson, 2016.

C. albicans é uma levedura comensal facilmente encontrada na mucosa bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital e pele de seres humanos desde o nascimento, mas em circunstâncias excepcionais, quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico devido a fatores predisponentes (patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos), pode haver um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos por estes microrganismos, ocasionando infecções denominadas candidíases (VALLE; RENDE; OKURA, 2010; MARTINS et al., 2002; SUZUKI, 2009).

A levedura está muito bem adaptada ao corpo humano e pode colonizá-lo sem produzir sinais de doença (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; RIBEIRO, 2007). Esta relação de equilíbrio entre *Candida* e o hospedeiro é propiciada pela manutenção da integridade das barreiras teciduais, pela relação harmônica da microbiota autóctone e pelo funcionamento adequado do sistema imunológico humano. Em contrapartida, o fungo, por sua parte, expressa de forma equilibrada a sua capacidade de aderência e de produção de enzimas e toxinas (VIEIRA, 2005).

2.2 Parede celular da *Candida albicans*

As células de *Candida albicans* possuem a parede celular composta de aproximadamente 80 a 90% de polissacarídeos de glicose com ramificações e ligações β -1,6 e β -1,3. Moléculas de N-acetil-D-glicosamina ligadas a quitina contendo ligações β -1,4

e polímeros de manose ligados covalentemente as manoproteínas, também são encontradas na composição desta estrutura, além de proteínas (6 a 25%) e pequenas quantidades de lipídios (BASMACIYAN et al., 2019).

Sabe-se que o arranjo molecular está disposto em camadas, entretanto, ainda não há consenso sobre a quantidade de camadas existentes. O aparecimento destas camadas é variável e parece estar relacionado especificamente a cepa examinada, as condições de crescimento, a morfologia e a preparação das amostras (WALKER; WHITE, 2017). Os polissacarídeos microfibrilares de glicana e quitina são os componentes que dão rigidez a estrutura da parede e parecem estar mais concentrados na camada interna da parede celular, adjacente à membrana plasmática. Em contraste, as proteínas e manoproteínas parecem ser dominantes na camada mais externa da parede celular, embora elas também estejam presentes em toda parede celular. Algumas das proteínas podem estar covalentemente ligadas a glicanas (NETEA et al., 2008).

Evidências citoquímicas e estudos citológicos indicam que a sobreposição das camadas da parede celular parece estar relacionada com a distribuição das manoproteínas em vários níveis dentro de sua estrutura. De uma maneira geral, a estratificação da parede celular não é resultante de diferenças qualitativas dos componentes individuais e sim de diferenças quantitativas nas proporções das glicanas, quitina e manoproteínas em cada camada (REYNA-BELTRÁN et al., 2019).

2.3 Fatores de virulência da *Candida albicans*

Os microrganismos expressam mecanismos que permitem a colonização ou infecção no hospedeiro e neste contexto, muitos patógenos incluindo *Candida*, expressam uma série de estratégias específicas para se estabelecer, colonizar, causar a doença e superar as defesas de hospedeiros susceptíveis (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Os fatores de virulência de *C. albicans* aumentam a eficácia no desenvolvimento de infecções localizadas em mucosas ou sistêmicas dependendo do estágio e da natureza da resposta do hospedeiro. Geralmente, estes processos infecciosos são favorecidos pela ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro. Aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os principais fatores descritos deste fungo que conferem a habilidade de colonizar e posteriormente causar a infecção (HÖFS; MOGAVERO; HUBE et al., 2016).

2.3.1 Aderência

Ambos, processo infeccioso e colonização, iniciam-se com a aderência da levedura nas células epiteliais. A presença de receptores específicos na membrana citoplasmática é necessária para a fixação e penetração intracelular do fungo (MAGDALENA; PERRONE, 2001). A adesão às superfícies celulares do hospedeiro é influenciada por fatores como a formação do tubo germinativo, disponibilidade de carboidratos, pH, temperatura, produção de fosfolipases, de proteases e de outras enzimas extracelulares (VIDOTTO et al., 2003). A adesão das células de *Candida* é um fenômeno complexo e multifatorial que se baseia na expressão de diversos tipos de adesinas nas superfícies de células modificadas morfológicamente. Além disso, a habilidade em formar biofilme sobre as células do hospedeiro é uma característica marcante deste patógeno e resulta numa estabilidade na aderência do fungo aos tecidos (KHAN et al., 2010). O mecanismo de aderência envolve glicoproteínas, proteínas do tipo lectinas que apresentam a capacidade de identificar vários tipos de açúcares e receptores para a fração C3b do sistema complemento e, por parte do hospedeiro, receptores celulares para as adesinas de *Candida* como fibrina, fibronectina e laminina, que favorecem a colonização da matriz extracelular (RIBEIRO, 2008).

2.3.2 Polimorfismo

As espécies de *Candida* spp. podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval característica das leveduras ou podem crescer sob a forma filamentosa através da produção de tubos germinativos resultando numa conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de hifas e pseudohifas (figura 2) (CARDOSO, 2004).

A habilidade de alternar entre a forma unicelular de levedura e a forma filamentosa é conhecida como dimorfismo. Alguns autores têm proposto a utilização do termo polimorfismo para designar esta propriedade, visto que existem formas celulares intermediárias entre a levedura e a hifa (GOW et al., 2012).

A formação de micélio por *Candida* spp. tem sido relacionada com o aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial que favorece maior aderência, dificultando a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imune (RIBEIRO, 2008). As células leveduriformes, quando fagocitadas por macrófagos e neutrófilos, produzem hifas e secretam proteases associadas as hifas que matam estas células fagocíticas (KHAN et al., 2010). As hifas têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células epiteliais humanas do que os blastoconídios. Na forma de hifa, *Candida*

albicans é invasiva e patogênica, enquanto na forma de levedura é comensal e não patogênica (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

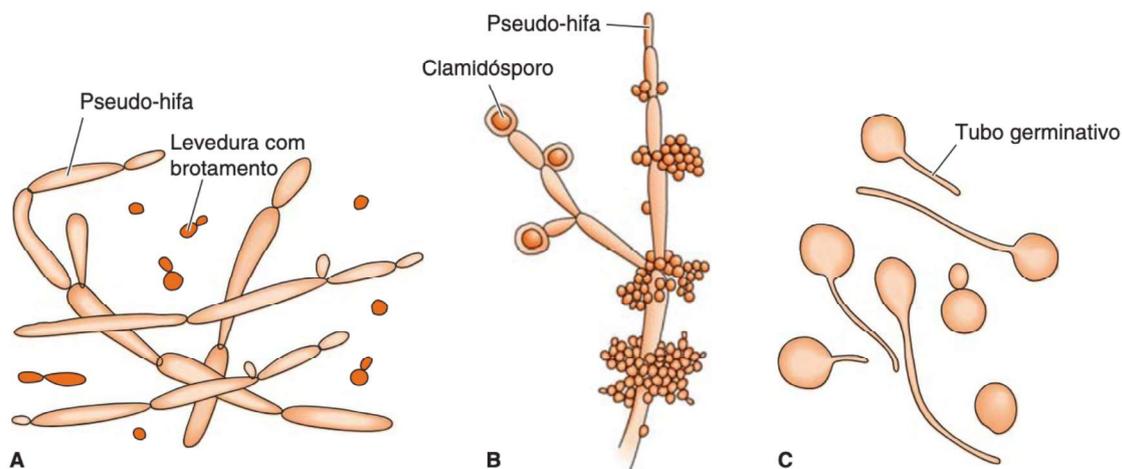


Figura 2 – Polimorfismo da *Candida albicans*. A: Leveduras em brotamento e pseudo-hifas em tecidos ou exsudatos. B: Pseudo-hifa e clamidósporos em cultura a 20°C. C: Tubos germinativos a 37°C.

Fonte: Levinson, 2016.

2.3.3 Variabilidade fenotípica

A variabilidade fenotípica é expressa pelo fenômeno de switching, além disso pode ser caracterizada pela alta frequência, reversibilidade e por demonstrar diferenças nas propriedades de superfície celular de *C. albicans* e nos aspectos morfológicos das colônias fúngicas. Como consequência, leva a alteração na aderência às células epiteliais, na suscetibilidade antifúngica e na atividade fungicida de neutrófilos (RIBEIRO, 2008). As colônias mudam sua aparência e assumem diferentes formas, incluindo forma lisa, áspera, forma de estrela, pontiaguda, enrugada e distorcida (KHAN, 2010; KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009).

O switching é reversível, ocorre espontaneamente em estado de estresse e resulta em mudanças no comportamento da superfície da célula, aparência da colônia e metabolismo, atributos bioquímicos e moleculares para se tornar mais virulenta e eficaz durante a infecção (KHAN, 2010)

Mudança fenotípica é uma parte muito importante da adaptabilidade do patógeno para a mudança de ambiente durante a invasão do organismo humano. A capacidade de infectar muitos tecidos é fundamental para o sucesso do ataque e disseminação dentro do hospedeiro (KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009).

2.3.4 Produção de exoenzimas

Várias substâncias produzidas por *C. albicans* têm sido associadas à infecção e são consideradas como fatores de virulência (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Dentre as diversas enzimas produzidas, destacam-se as proteases e as fosfolipases, capazes de promover a destruição nas membranas celulares das células hospedeiras. As fosfolipases degradam os fosfolipídios da membrana plasmática das células do hospedeiro, alteram as características da superfície dessas células, facilitando a aderência e, conseqüentemente, a infecção. As proteases hidrolisam ligações peptídicas das proteínas presentes nas células do hospedeiro (AGUIAR, 2007).

A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção. Essa enzima normalmente se encontra localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo e atua hidrolisando os fosfolipídeos em lisofosfolipídeos que causam dano à célula epitelial. Este atributo é específico de *C. albicans*, a qual apresenta esta atividade intensificada durante a invasão tecidual (KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009; ZARDO; MEZZARI, 2004).

As proteases desempenham um papel importante na degradação dos componentes da mucosa como o colágeno e a queratina, assim como de componentes do sistema imunológico como citosinas e anticorpos, facilitando a invasão dos tecidos do hospedeiro (OMBRELLA; RAMOS; RAMOS, 2008).

2.3.5 Produção de toxinas

As toxinas produzidas por este fungo podem ser divididas em dois grandes grupos, o primeiro inclui a glicoproteína-candidoxina, uma toxina de alto peso molecular, e o segundo engloba as toxinas de baixo peso molecular (MAGDALENA; PERRONE, 2001). A produção de substâncias toxigênicas, tais como as toxicoglicoproteínas e candidoxinas, ocorre durante o processo infeccioso por espécies de *Candida*. Estas toxinas provocam, em determinadas concentrações, a morte de animais de laboratório, suscitam a produção de anticorpos e podem ser neutralizadas por ação de toxóides, demonstrando a sua importância como elemento integrante do mecanismo de infecção fúngica (RIBEIRO, 2008).

2.4 Produção de biofilme por *Candida albicans*

Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados, principalmente, a formação de

comunidades microbianas aderidas a diversas superfícies, denominadas biofilmes (SUZUKI, 2009).

O biofilme é uma comunidade microbiana caracterizada pela organização de células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato ou interface e embebidas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas que as próprias células produzem. Os biofilmes podem se formar em uma grande variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos, sistema de tubulação de água potável, ambientes industriais e sistemas aquáticos naturais (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Geralmente os biofilmes são constituídos por células microbianas que exibem um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes quando comparadas as células livres e pela substância extracelular polimérica, também denominada matriz extracelular que pode corresponder de 50% a 90% do total de carbono orgânico do biofilme e ser considerada como a estrutura mais abundante no biofilme, podendo variar de acordo com suas propriedades químicas e físicas, mas é composta principalmente de polissacarídeos (DONLAN; COSTERTON, 2002).

O processo de desenvolvimento destas comunidades ocorre em três fases e dura aproximadamente de 24 a 48 horas. Na fase inicial, as células planctônicas, na forma de levedura aderem à superfície do substrato. Após a aproximação das células, ocorre a interação destas com superfícies hidrofóbicas e eletrostáticas. A produção de adesinas pela levedura e a aderência de plaquetas e fibrinas do hospedeiro ao substrato ajudam ainda mais na adesão primária. Na fase secundária as células aderidas proliferam formando microcolônias e começam a produzir a matriz extracelular. Neste momento existe o aparecimento de mecanismos de comunicação intercelulares que levam a uma expressão diferencial de genes. Esses genes são responsáveis na transição de leveduras para hifas, na arquitetura da parede celular e na coesividade do biofilme dada pela matriz. E por último, quando as células começam a se confluírem, a rede formada começa a ser constituída de uma transição de células diferenciadas em pseudohifas, hifas e leveduras, tudo envolvido pela matriz extracelular polimérica e promovendo um crescimento tridimensional (SUZUKI, 2009).

O crescimento do biofilme está limitado pela existência de nutrientes no meio ambiente e pela difusão desses mesmos nutrientes através da matriz do biofilme, bem como pela liberação de resíduos (CARDOSO, 2004).

2.4.1 Biofilme como fator de virulência

Estas comunidades microbianas assumem grande importância no contexto clínico porque estão associadas a persistência dos microrganismos nos processos infecciosos. As células que crescem em biofilmes apresentam características fenotípicas diferentes das células em suspensão, notadamente um aumento de resistência aos antifúngicos e as defesas do hospedeiro (DONLAN; COSTERTON, 2002).

As maiores vantagens dos microrganismos se organizarem nestas comunidades consistem na maior capacidade de captação de nutrientes, no favorecimento de um crescimento mais ordenado e na maior proteção contra radiações UV, fagocitose, desidratação e resistência a antifúngicos (SUZUKI, 2009).

Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos estão relacionados com limitações difusionais da passagem do agente antimicrobiano pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (CARDOSO, 2004). Outro mecanismo proposto para a resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos é que as células associadas ao biofilme crescem significativamente mais devagar do que as células planctônicas e, como consequência, captam os agentes antimicrobianos mais lentamente (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A adesão e formação de biofilme sobre os dispositivos médicos representa um grave problema na medicina. Nas últimas décadas, a incidência de infecções microbianas correlacionadas com a formação de biofilme chega a 65% dos casos. Todas as variantes morfológicas conhecidas (leveduras, pseudohifas e hifas) podem crescer em biofilme e geralmente expressam propriedades diferentes das suas respectivas células planctônicas. A produção de proteases é maior durante a formação de biofilme. Além disso, as células de *C. albicans* expressam diversos genes que influenciam na patogenicidade e os produtos desses genes participam nos mecanismos de adesão, síntese de carboidratos, resistência às drogas como as bombas de efluxo, por exemplo e no quorum sensing, caracterizado como um mecanismo de comunicação intra e interespécies microbianas que possibilita aos microrganismos expressarem alterações fenotípicas marcantes quando estes se encontram em altas densidades populacionais (KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009).

2.5 Manifestações clínicas da Candidíase

Candida albicans faz parte da microbiota normal em cerca de 50% dos indivíduos (NOBILE; JOHNSON, 2015). As infecções têm várias manifestações clínicas, desde

distúrbios mucocutâneos superficiais até uma infecção invasiva que afeta múltiplos órgãos (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

2.5.1 *Candida albicans* na cavidade oral

A candidíase é a infecção fúngica mais comum na cavidade oral e é causada por espécies de *Candida*. Pensava-se anteriormente que 35% a 80% da população são portadores de *Candida* oral. Pesquisas recentes usando métodos de detecção molecular sugerem que espécies de *Candida* spp. são encontradas em todos os seres humanos como parte da flora oral normal (LEWIS; WILLIAMS, 2017; PETERS; WU; HAYES; AHN, 2017). A espécie mais comum em bocas infectadas e saudáveis é *Candida albicans*, e estima-se que seja encontrada em mais de 80% dos isolados de fungos orais. Outros tipos de *Candida* presentes na boca são *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (LEWIS; WILLIAMS, 2017; SAV; ALTINBAS; BESTEPE DURSUN, 2020; ASLANI et al., 2018; RAFIQ, 2020).

Vários fatores sistêmicos, locais, hereditários e ambientais levam a distúrbios na homeostase oral. Consequentemente, ocorre a transição da flora normal para o patógeno e uma infecção oportunista ocorre. As alterações levam ao crescimento excessivo de *Candida* ou a uma alteração na expressão de seus fatores de virulência (LEWIS; WILLIAMS, 2017; ZDANA VIČIENĚ et al., 2017). Os fatores predisponentes locais mais comuns para a candidíase são a má higiene bucal, uso de próteses removíveis, aparelhos ortodônticos e obturadores, xerostomia (boca seca), tabagismo, uso de inaladores de esteroides, dieta rica em carboidratos e doenças da mucosa oral. Os fatores predisponentes sistêmicos descritos são idade (os grupos de risco são idosos e recém-nascidos), gravidez, antibioticoterapia, corticoterapia sistêmica, doenças como tumores e sua terapêutica, doenças do aparelho digestivo, deficiências nutricionais (déficit de ferro, ácido fólico e vitaminas), endocrinopatia (diabetes, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo), doenças autoimunes, HIV e imunodeficiências primárias (BAUMGARDNER, 2019; SERRANO et al., 2020; SURYANA; SUHARSONO; ANTARA, 2020).

Na infecção pelo HIV/AIDS, a candidíase é um sinal precoce de imunodeficiência e pode indicar o estado imunológico e a progressão da doença nesses pacientes (SURYANA; SUHARSONO; ANTARA, 2020; DU et al., 2020).

A candidíase oral tem uma ampla gama de manifestações clínicas. Portanto, há uma divisão em candidíase primária, quando a infecção acomete apenas a cavidade oral e região perioral; e candidíase secundária, quando a infecção ocorre como parte de doença

sistêmica. A mucosa já está alterada e apta para infecção e lesões associadas a *Candida* spp. De acordo com suas características clínicas, que incluem mudança de cor, a candidíase é frequentemente dividida em branca e vermelha (BAUMGARDNER, 2019; HELLSTEIN; MAREK, 2019). A forma primária inclui quatro condições diferentes: candidíase pseudomembranosa, candidíase eritematosa aguda, candidíase eritematosa crônica e candidíase crônica hiperplásica ou nodular.

A candidíase pseudomembranosa (figura 3) é a forma mais comum e é caracterizada por manchas ou placas brancas na mucosa oral que podem ser facilmente descoladas por raspagem suave, pois apenas a camada superior do epitélio da mucosa está infectada. A possibilidade de remoção é um recurso diagnóstico diferencial aceito que distingue esta forma de candidíase de outras acumulações brancas na boca. Geralmente ocorre em recém-nascidos (com probabilidade de serem infectados pelo canal do parto), indivíduos anêmicos e imunodeficientes (HIV, diabetes, malignidade), pacientes em terapia com esteróides tópicos e aqueles com xerostomia. As lesões podem ser localizadas e generalizadas, acometendo mais comumente a língua, mucosa bucal, palato mole e duro. Muitas vezes é acompanhada por distúrbios do paladar e um sabor desagradável na boca (LEWIS; WILLIAMS, 2017; BAUMGARDNER, 2019; HELLSTEIN; MAREK, 2019; MILLSOP; FAZEL, 2016).



Figura 3 - Candidíase pseudomembranosa. Múltiplas placas brancas no palato mole.

Fonte: Neville et al., 2009.

A candidíase eritematosa aguda (figura 4) ocorre como efeito colateral da terapia sistêmica com antibióticos de amplo espectro e imunossupressores e corticosteroides, alterando, conseqüentemente, a flora da cavidade oral. Manifesta-se clinicamente como uma lesão avermelhada dolorosa no dorso da língua, e frequentemente há despilação da língua, com sintomas de queimação e alterações do paladar (LEWIS; WILLIAMS, 2017; BAUMGARDNER, 2019; HELLSTEIN; MAREK, 2019).



Figura 4 - Candidíase eritematosa aguda. As áreas desnudas irregulares (não as áreas brancas) da superfície dorsal da língua representam a candidíase eritematosa. O paciente havia usado um antibiótico de amplo espectro.

Fonte: Neville et al., 2009.

A candidíase eritematosa crônica (figura 5) também é conhecida como estomatite protética ou palatite protética. É típico para pacientes que usam próteses móveis de acrílico e é mais comumente encontrado no palato em pessoas com próteses totais. O aparecimento da doença é facilitado pela má higiene oral e higiene inadequada das próteses. As lesões na mucosa são vermelhas e limitadas às áreas cobertas pela substituição protética, às vezes acompanhadas de sensação de queimação, mas muitas vezes são assintomáticas e detectadas apenas pelo exame odontológico (LEWIS; WILLIAMS, 2017; BAUMGARDNER, 2019; HELLSTEIN; MAREK, 2019; O'DONNELL et al., 2015; GAD; FOUUDA, 2020).

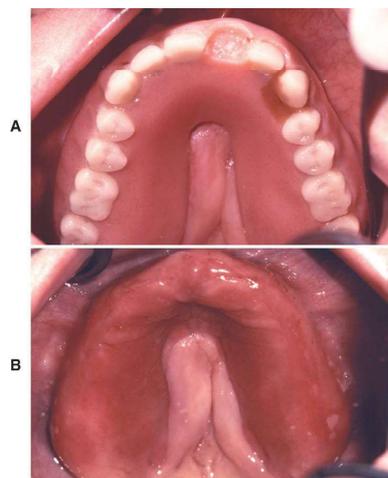


Figura 5 - Candidíase eritematosa crônica. A: Prótese superior com selamento palatino incompleto associada a hiperplasia tecidual na linha média. B: A área da mucosite corresponde ao contorno da prótese.

Fonte: Neville et al., 2009.

A candidíase hiperplásica crônica (figura 6) também é chamada de leucoplasia por *Candida*. Ao contrário da forma pseudomembranosa, esses depósitos brancos não podem ser removidos por raspagem leve. Caracteriza-se pela infiltração profunda do tecido da cavidade oral pelas hifas do fungo. Mais comumente, é encontrado nas partes laterais da língua e mucosa oral. Os clusters podem ser homogêneos ou heterogêneos. Lesões heterogêneas são condições pré-cancerosas porque são um fator predisponente para transformação maligna (LEWIS; WILLIAMS, 2017; HELLSTEIN; MAREK, 2019).



Figura 6 - Candidíase hiperplásica. Esta lesão na região anterior da mucosa jugal lembra clinicamente uma leucoplasia, por ser uma placa branca que não pode ser removida pela raspagem.

Fonte: Neville et al., 2009.

Entre as doenças secundárias e outras relacionadas à *Candida*, é importante citar queilite angular, glossite rombóide mediana e candidíase mucocutânea crônica (CMC) (LEWIS; WILLIAMS, 2017; HELLSTEIN; MAREK, 2019).

Verificou-se também que os fatores de suscetibilidade diferem significativamente entre candidíase gastrointestinal/vulvovaginal e infecções por CMC. Os primeiros são muito mais dependentes de fatores microambientais, como nutrientes locais, pH, ácidos biliares e flora comensal local. Ao mesmo tempo, o sequenciamento genômico de pacientes com CMC revelou defeitos de imunidade do tipo 3, mais especificamente nas vias da Interleucina-17 (IL-17) (KUMAMOTO, 2011; CASSONE, 2015; KASHEM; KAPLAN, 2016). Descobriu-se que as células T auxiliares (Th17) têm um papel crítico na defesa imunológica contra *Candida*, mas também um papel considerável contra outros micróbios (NG et al., 2010; SOLTÉSZ et al., 2015). Até 80% dos pacientes com CMC de início na infância desenvolvem infecções recorrentes ou graves com outros organismos que não *Candida*, incluindo infecções cutâneas por dermatófitos e septicemia bacteriana ocasional (KIRKPATRICK; HILL, 2001; BOLOGNIA; SCHAFFER; CERRONI, 2018).

Além da mucosa, *Candida* spp. estão presentes em todas as superfícies dentárias (esmalte, dentina e cimento). O fungo cresce em rachaduras e sulcos do esmalte e pode penetrar através dos túbulos dentinários abertos, desempenhando um papel significativo nas infecções orais (CHEVALIER; RANQUE; PRÊCHEUR, 2018; SALEHI et al., 2020).

O tratamento de infecções orais leves a moderadas causadas por *C. albicans* geralmente consiste em antifúngicos aplicados topicamente no interior da cavidade oral por 7 a 14 dias, como exemplo clotrimazol, miconazol ou nistatina. Para infecções graves, o fármaco antifúngico mais comumente utilizado é fluconazol, administrado por via oral ou intravenosa (CDC, 2021).

2.5.2 *Candida albicans* em Gastroenterologia

Pensa-se que os seres humanos são portadores de *C. albicans* por natureza, e o trato gastrointestinal é um dos principais estoques do organismo. Esta espécie é o patógeno oportunista mais comum entre os fungos e pode causar doenças que variam de infecções superficiais a invasivas e com risco de vida (MISHRA; KOH, 2018). A entrada de *C. albicans* na corrente sanguínea e o desenvolvimento de candidíase disseminada ocorrem principalmente após uma infecção invasiva do sistema gastrointestinal (BASMACHIYAN, 2019; TONG; TANG, 2017; ZHU; FILLER, 2010). Os principais fatores de risco que promovem a transição de *C. albicans* de um organismo comensal ou simbiótico para um organismo patogênico são disbiose da microbiota residencial, disfunção imunológica e danos à barreira muco-intestinal (ALLERT et al., 2018).

Pelo menos um dos quatro eventos é necessário para candidíase disseminada: invasão direta de células epiteliais em capilares e vasos sanguíneos, translocação indireta de células de *C. albicans* fagocitadas por células imunes do hospedeiro, dano direto de barreiras mucosas e disseminação de biofilmes fúngicos (NOBILE; JOHNSON, 2015; ALLERT et al., 2018).

O tipo mais comum de esofagite infecciosa causada por fungos é a candidíase esofágica causada por *C. albicans* (figura 7) (ROBERTSON; NAGRA; MEHTA, 2013; MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019). O risco de infecção existe em pessoas imunossuprimidas (AIDS, neoplasias hematológicas, pacientes transplantados) e em pacientes com comorbidades como diabetes, consumo de álcool e tabagismo, antibioticoterapia, glicocorticoides, quimioterapia, radioterapia, lesão esofágica superior e idade avançada (ROBERTSON; NAGRA; MEHTA, 2013; MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019;

ROSOLOWSKI; KIERZKIEWICZ, 2013; ALSOMALI et al., 2017; HOVERSTEN; OTAKI; KATZKA, 2019).



Figura 7 - Candidíase esofágica. Presença de placas de coloração branca a amarelo claro na mucosa vista por imagens endoscópicas.

Fonte: Robertson et al., 2022.

O quadro clínico pode ser assintomático, mas é mais comumente manifestada por odinofagia aguda, disfagia e dor atrás do esterno (ROSOLOWSKI; KIERZKIEWICZ, 2013; MUSHI et al., 2018). As imagens endoscópicas apresentam placas de coloração branca a amarelo claro na mucosa, que não podem ser lavadas e, após sua remoção, a mucosa fica vermelha e ulcerada (MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019; ROSOLOWSKI; KIERZKIEWICZ, 2013). A candidíase esofágica, ao contrário da orofaringe, deve sempre ser tratada com antifúngicos sistêmicos em vez de tópicos. Três grupos de medicamentos podem ser usados na terapia: nistatina, anfotericina B e antifúngicos azólicos (mais comumente fluconazol), onde a escolha depende do grau de imunossupressão (MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019; HOVERSTEN; KAMBO; KATZKA, 2018). Esofagite causada por *C. albicans* é na maioria das vezes superficial, mas complicações e invasão com disseminação hematogênica (fungemia) também são possíveis e podem posteriormente levar à infecção de outros órgãos (MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019).

Doenças fúngicas do gastroduodeno são menos comumente relatadas. Geralmente ocorrem como infecção secundária de indivíduos com tumores nesta área e infiltram úlceras benignas ou malignas com capacidade reduzida de cicatrização. Endoscopicamente, parece um depósito branco ou acinzentado que se separa facilmente da mucosa e está localizado na base da úlcera, que se resolve através de terapia antiúlcera (CASTELO BRANCO et al., 2017)

A possível infecção intestinal pode ser superficial quando a invasão é limitada à mucosa e submucosa, mas também pode ser profunda, onde a penetração é ilimitada,

ocorrendo destruição tecidual e perfuração da parede intestinal ou disseminação para locais distantes. As infecções fúngicas são mais comumente associadas à doença inflamatória intestinal (DII). Os fatores predisponentes são danos na mucosa, causados principalmente por cirurgia e quimioterapia, e função de neutrófilos prejudicada devido à terapia tumoral ou uso prolongado de glicocorticoides. Ao administrar TNF α , deve-se suspeitar de *C. albicans* se as infecções forem detectadas precocemente durante o tratamento da DII (STAMATIADES et al., 2018)

A interação de *C. albicans* como patógeno com a mucosa intestinal ocorre na forma de adesão, invasão, dano e apoptose. O principal papel na infecção e, conseqüentemente, na patogenicidade, é desempenhado por substâncias secretadas pelas hifas (TONG; TANG, 2017; ALLERT et al., 2018; MOYES; RICHARDSON; NAGLIK, 2015).

O aumento da colonização e infecção aumenta a secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) pelas células hospedeiras, mas a *C. albicans* desenvolveu mecanismos para evitar sua atividade como o primeiro passo na adesão às células epiteliais intestinais (CEI). Além de defender contra AMPs, *C. albicans* deve quebrar a camada protetora do muco para atingir a camada de células epiteliais. Após aderir às mucinas, secreta enzimas mucinolíticas. Após o primeiro contato com as CEI, a maioria das células fúngicas se converte para a forma de hifas e expressa genes que promovem a adesão liberando adesinas e invasões de hifas. A liberação de moléculas de superfície, ou seja, adesinas, é crucial no processo de adesão ao tecido hospedeiro. Também pode aderir aos enterócitos através de moléculas de polissacarídeos na superfície da parede celular (BASMACIYAN et al., 2019; NAGLIK et al., 2017; RICHARDSON; HO; NAGLIK, 2018; GILBONA; AMADOR-GARCÍA; GIL; MONTEOLIVA, 2018).

A invasão por *C. albicans* ocorre por meio de dois mecanismos: endocitose e penetração ativa. A endocitose é um processo dirigido pelo hospedeiro que não requer hifas sustentáveis e ocorre nas primeiras quatro horas de interação. A penetração ativa nas CEI é um procedimento que requer formas sustentáveis do fungo, mas não requer atividade do hospedeiro e depende do tipo de células epiteliais. Acredita-se que a penetração ocorra pela combinação de pressão mecânica criada pelo alongamento progressivo das hifas e atividade lítica. Este procedimento permite a entrada de *C. albicans* nos enterócitos enquanto as junções intercelulares permanecem intactas. Ao contrário das células orais, os fungos precisam de genes específicos para invadir os enterócitos (BASMACIYAN et al., 2019; ALLERT et al., 2018).

A invasão fúngica contribui para danos de CEI e morte celular. Supõe-se que a morte celular necrótica seja o principal mecanismo de dano observado durante a translocação de *C. albicans* através de enterócitos. Após a formação das hifas, é secretada uma toxina citolítica chamada candidalisina, responsável por danificar as células hospedeiras. É a primeira toxina peptídica identificada em patógenos fúngicos humanos (BASMACIYAN et al., 2019).

A terapia antifúngica deve ser utilizada em pacientes com infecções intra-abdominais e fatores de risco para candidíase, como cirurgia abdominal recente, pancreatite necrosante ou vazamento de anastomose. Além disso, o controle da fonte de infecção deve ser incluído. A escolha da terapia antifúngica é semelhante à do tratamento da candidemia. Uma equinocandina é recomendada como terapia inicial, enquanto o fluconazol é uma terapia alternativa. Os azóis são usados se a infecção não for causada por espécies de *Candida* resistentes a eles (PAPPAS et al., 2015).

2.5.3 *Candida albicans* em Dermatovenerologia

As infecções fúngicas são uma das ocorrências mais comuns em dermatologia. *Candida albicans* é responsável por 80-90% das infecções, mas outras espécies de *Candida* são frequentemente vistas como patógenos causadores (BOLOGNIA; SCHAFFER; CERRONI, 2018). As infecções por *Candida* são consideradas oportunistas na maioria dos casos porque *Candida albicans* é um fungo normalmente comensal. No entanto, quando a imunidade do hospedeiro é prejudicada por várias razões possíveis, uma infecção patogênica pode ocorrer (QIN et al., 2016). No geral, um equilíbrio entre o sistema de defesa do hospedeiro e os fatores de virulência de *Candida albicans* é a chave para a relação comensal. *C. albicans* geralmente causa infecções superficiais da pele, enquanto micoses “profundas”, com envolvimento da derme e tecido subcutâneo, são raras. No entanto, em pacientes gravemente imunocomprometidos, pode ocorrer uma infecção fúngica invasiva, resultando em penetração profunda e candidíase sistêmica, muitas vezes com desfecho fatal (RICHARDSON; HO; NAGLIK, 2018).

A candidíase mucocutânea tem um amplo espectro de apresentações clínicas. Elas dependem do local do corpo afetado, da faixa etária do paciente e de vários fatores predisponentes. As características unificadoras clinicamente relevantes da candidíase são eritema, erosões e placas brancas facilmente removíveis. Enquanto placas brancas são mais frequentemente vistas na mucosa do que na pele, eritema e erosões são apresentações amplamente inespecíficas. Portanto, fazer uma boa anamnese com atenção

especial aos potenciais fatores predisponentes do paciente é fundamental para que o dermatologista estabeleça uma suspeita clínica de candidíase. Quando regiões típicas do corpo são afetadas, isso também é uma pista para um diagnóstico bem-sucedido (SOLTÉSZ et al., 2015).

Os locais mais comuns de envolvimento são as zonas intertriginosas, por exemplo, submamária, pregas inguinais e pregas interglúteas. As infecções por *Candida* estão presentes com manchas eritematosas acentuadamente marcadas, às vezes erosivas, com descamação leve da superfície, e pápulas e pústulas satélites na periferia (METIN; DILEK; BILGILI, 2018). Essas pústulas são geralmente estéreis e são chamadas de pústulas espongiiformes devido às coleções de neutrófilos dentro da epiderme (BOLOGNIA; SCHAFFER; CERRONI, 2018).

A *Candida* também pode causar paroníquia crônica e aguda e onicomicose. A paroníquia é uma inflamação da pele ao redor de uma unha (área periungueal), geralmente é causada por infecção bacteriana por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp. A onicomicose é uma infecção fúngica das unhas e, quando causada por *Candida*, geralmente é secundária à paroníquia crônica (LEGGIT, 2017).

Erosio interdigitalis blastomycetica (EIB) é outra infecção comum por *Candida* no espaço entre o terceiro e quarto dedos, geralmente em pacientes cujas mãos estão frequentemente na água. Supõe-se que esse espaço seja pelo menos móvel, de modo que a retenção de água, suor e outros agentes irritantes potenciais, como sabão, provavelmente está criando uma base perfeita para a infecção por *Candida*. Normalmente, há uma erosão central cercada por uma borda de pele branca macerada (SCHLAGER; ASHACK; KHACHEMOUNE, 2018).

Em casos raros, a *Candida albicans* pode causar foliculite, geralmente na área da barba em um homem adulto com imunossupressão grave. Nesses casos, pode envolver camadas profundas da pele com achado clínico de nódulos mais profundos ao redor dos pelos e pústulas.

A área genital em homens e mulheres é um local frequente de infecção por *Candida*. Aproximadamente 15-30% das mulheres assintomáticas são portadoras vaginais de *Candida* spp., aumentando para 40% durante a gravidez (SPINILLO et al., 1993). Presume-se que quase todas as mulheres tenham pelo menos um incidente de candidíase vulvovaginal em sua vida. Nos homens, são observadas balanite e balanopostite. Em ambos os sexos, o envolvimento da região perianal também é possível. Mesmo sem

achados clínicos na pele, prurido localizado apenas na área genital e perianal pode ser um sinal de candidíase (SWAMIAPPAN, 2016).

Outra apresentação da infecção por *Candida* é a dermatite das fraldas (figura 8). A dermatite das fraldas é uma inflamação da pele sob a fralda, comumente observada em bebês, mas também em adultos incontinentes. Muitas vezes é uma forma de dermatite de contato irritante, mas muitos casos são complicados com superinfecção por *Candida*. A dermatite das fraldas é o resultado cumulativo de vários fatores que danificam a barreira normal da pele. No início, a oclusão que leva à maceração da pele e ao contato da pele com a urina foi sugerida como as principais razões, mas hoje as bactérias fecais e o pH alcalino da urina são considerados como tendo um papel maior (BOLOGNIA; SCHAFFER; CERRONI, 2018).



Figura 8 – Dermatite de fraldas por *C. albicans* – assaduras. Observa-se a ampla área de inflamação na região perineal em um bebê.

Fonte: Levinson, 2016.

A pele dos recém-nascidos difere da dos adultos de várias maneiras. A possibilidade de a *Candida* produzir infecção cutânea disseminada e infecção sistêmica é, portanto, maior, especialmente em recém-nascidos prematuros (VISSCHER et al., 2015). A candidíase congênita representa uma infecção intrauterina. Extensas áreas de eritema, pápulas e pústulas podem ser observadas, bem como eritema difuso “tipo queimadura”, com descamação e erosões (DARMSTADT; DINULOS; MILLER, 2000). A candidíase neonatal é adquirida durante o parto ou pós-natal e é mais semelhante à apresentação do adulto, envolvendo locais mais típicos, como a fralda e as áreas intertriginosas (GREENBERG; BENJAMIN, 2014).

A síndrome de hiperimunoglobulina E (HIES) é outro grupo de doenças hereditárias caracterizadas, entre outras coisas, por candidíase cutânea recorrente, ocorrendo em aproximadamente 80% dos pacientes com HIES (MOGENSEN, 2016). Mutações no gene

que codifica STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) causam a forma clássica de HIES, então a suscetibilidade a infecções por *Candida* revela o importante papel das citocinas dependentes de STAT3 (por exemplo, IL-23, IL-21, IL-6) na diferenciação de células T auxiliares produtoras de IL-17 (MILNER et al., 2008).

Além de defeitos hereditários nos mecanismos de imunidade do hospedeiro, vários fatores externos contribuem para infecções por candidíase. Eles são comumente vistos em pacientes com diabetes mellitus, pacientes imunossuprimidos, como pacientes com HIV/AIDS, pacientes oncológicos recebendo quimioterapia e pacientes transplantados de órgãos tomando antibióticos sistêmicos de espectro (WANG et al., 2014; DE LEON et al., 2002; DORKO et al., 2005; DICLE et al., 2009; BASSETTI et al., 2006; XU et al., 2008).

A estratégia de tratamento da candidíase cutânea depende da localização da infecção, sua extensão e do estado imunológico do paciente. A maioria geralmente responde a agentes antifúngicos tópicos, mas se o paciente estiver imunocomprometido, tiver extensas áreas afetadas ou não responder à terapia tópica, o tratamento sistêmico é necessário. Embora muitos agentes antifúngicos estejam disponíveis, nem todos são eficazes contra *Candida* (PAPPAS et al., 2015).

A eficácia limitada não é o único desafio terapêutico. Atualmente, há crescente resistência de patógenos a agentes antifúngicos, e espécies de *Candida* estão entre elas. Geralmente, a candidíase mucocutânea responde bem aos azólicos tópicos (miconazol, clotrimazol e econazol) (BOLOGNIA; SCHAFFER; CERRONI, 2018; PAPPAS et al., 2015; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Dos polienos tópicos, a nistatina é mais comumente usada, especialmente para candidíase oral e vulvovaginal (PAPPAS et al., 2015; CHOUKRI; BENDERDOUCHE; SEDNAOUI, 2014).

Um agente antifúngico que é mais eficaz contra *Candida* do que os azólicos, alilaminas ou benzilaminas é a ciclopirox olamina, que está sendo cada vez mais usado na prática dermatológica (SONTHALIA; AGRAWAL; SEHGAL, 2019). Se for necessário tratamento sistêmico, o fluconazol é geralmente a droga de escolha (PAPPAS et al., 2015). No entanto, recentemente foram detectadas cepas resistentes aos azóis. As opções alternativas são o itraconazol ou um dos triazóis de segunda geração disponíveis. Se o paciente não estiver respondendo ao tratamento com azólicos, deve-se tentar a terapia com anfotericina B. Membros da classe equinocandina de drogas antifúngicas (micafungina, anidulafungina, acetato de caspofungina) também mostraram eficácia em infecções por *Candida* (PAPPAS et al., 2015; VAZQUEZ; SOBEL, 2006).

Até recentemente, o cetoconazol também era comumente usado, mas a EMA e a FDA o retiraram devido à potencial hepatotoxicidade, e hoje seu uso é restrito apenas a infecções fúngicas complicadas e não responsivas. Seu uso sistêmico é limitado em vários países, embora ainda seja usado localmente, como xampu (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013).

O efeito colateral mais comum dos antifúngicos tópicos é a irritação local da pele, mas raramente a verdadeira dermatite alérgica de contato. Os antifúngicos sistêmicos podem causar reações cutâneas graves, incluindo necrólise epidérmica tóxica e síndrome de Stevens-Johnson. O fluconazol pode causar danos hepáticos potenciais. O principal mecanismo de hepatotoxicidade são as interações medicamentosas causadas pela inibição das enzimas do citocromo P450, que desempenham um papel importante no metabolismo de drogas lipofílicas. Todos os antifúngicos sistêmicos devem ser usados com cautela em pacientes com doença renal ou hepática (GUPTA, 2007).

Outras medicações tópicas tradicionais, utilizadas adicionalmente no tratamento da candidíase cutânea são: permanganato de potássio (KMnO₄), solução de violeta de genciana, solução de Burow (acetato de alumínio) (BOLOGNIA; SCHAFFER; CERRONI, 2018). Além disso, na busca de novas preparações antifúngicas, o uso da prata ressurgiu (TALAPKO et al., 2020). Recentemente, o efeito de nanopartículas de prata (AgNPs) em vários dermatófitos e leveduras, incluindo *Candida* spp. foi testado e muitos estudos mostraram que as AgNPs têm potencial no tratamento da candidíase (HASSAN; MANSOUR; MAHMOUD, 2013; CHOI et al., 2019).

2.5.4 Infecções invasivas por *Candida albicans*

A candidíase invasiva refere-se a infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. Na maioria das vezes ocorrem após a passagem pela barreira intestinal. Por exemplo, após a cirurgia, pode se espalhar para a cavidade abdominal e entrar na corrente sanguínea e causar candidíase (PAPPAS et al., 2018). O crescimento excessivo de *C. albicans* pode desencadear um comprometimento da resposta imune, levando a infecções oportunistas em vários órgãos, ou seja, candidíase invasiva (JABRA-RIZK et al., 2016).

Portanto, a doença invasiva geralmente é resultado de colonização aumentada ou anormal, juntamente com falta local ou generalizada de defesa do hospedeiro. A candidíase invasiva não é uma entidade clínica única, mas é um distúrbio com inúmeras manifestações clínicas que podem afetar potencialmente qualquer órgão (PAPPAS et al., 2018). A candidíase invasiva está intimamente relacionada ao desenvolvimento de tecnologia

médica e é amplamente reconhecida como uma causa significativa de morbidade e mortalidade no ambiente de assistência à saúde (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020). Pelo menos 15 diferentes *Candida* pode causar infecções em humanos. No entanto, cinco patógenos causam as infecções mais invasivas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, mas o patógeno mais comum no cenário clínico é *C. albicans* (PAPPAS et al., 2018).

As infecções invasivas por *Candida* estão mais frequentemente associadas à candidemia (espécies de *Candida* no sangue), principalmente em pacientes imunossuprimidos e naqueles que necessitam de cuidados intensivos. Pacientes imunossuprimidos apresentam risco especial de candidemia, incluindo aqueles com malignidades hematológicas (em pacientes que acabaram de se recuperar de um episódio de neutropenia), receptores de transplantes de células hematopoiéticas ou órgãos sólidos e aqueles que receberam agentes quimioterápicos para uma variedade de doenças diferentes. Outros fatores de risco estão associados a danos extensos da mucosa gastrointestinal, antibióticos de amplo espectro e cateteres venosos centrais. Quando a *C. albicans* entra na corrente sanguínea, pode causar infecções da bexiga e rins, endoftalmite, meningite, infecções osteoarticulares, endocardite, peritonite e infecções intra-abdominais, pneumonia, empiema, mediastinite e pericardite (PAPPAS et al., 2018; YAPAR, 2014).

Candidúria refere-se à presença de *Candida* na urina. A candidúria como fonte de candidemia geralmente ocorre em pacientes com anormalidades do trato urinário, mais frequentemente obstrução do trato urinário e/ou naqueles que foram submetidos a um procedimento do trato urinário. É comum em pacientes hospitalizados, embora muitas vezes seja difícil distinguir colonização de infecção da bexiga. O transplante renal foi considerado um fator de risco para infecção ascendente e candidemia quando a candidúria estava presente. Estudos mostram que mais de 50% dos pacientes hospitalizados com candidúria têm *Candida albicans* isolada (KAUFFMAN et al., 2000).

C. albicans não costuma causar pneumonia clinicamente significativa em adultos. Apesar disso, a *Candida albicans* é frequentemente isolada do trato respiratório de pacientes em unidades de terapia intensiva, pacientes intubados ou pacientes com traqueostomia crônica. Na maioria dos casos, isso reflete a colonização das vias aéreas e não uma infecção (PAPPAS et al., 2015). A pneumonia por *Candida* foi observada em pacientes seriamente imunocomprometidos com doenças disseminadas, recém-nascidos com peso deficiente ao nascer e indivíduos com malignidades (BARTON et al., 2017). Como os problemas de contaminação confundem um diagnóstico ante-mortem, um diagnóstico

final de pneumonia por *Candida* invasiva precisa de verificação histológica, que normalmente é obtida apenas na autópsia. A lavagem broncoalveolar é uma ferramenta de diagnóstico para verificar a pneumonia e determinar o patógeno causador (SCHNABEL et al., 2014)

As espécies de *Candida* infectam ossos e articulações devido a sementeira hematogênica ou inoculação durante trauma, injeção intra-articular, procedimento cirúrgico ou uso de drogas injetáveis. As infecções osteoarticulares muitas vezes tornam-se sintomáticas meses ou até um ano após um episódio de fungemia ou procedimento cirúrgico. As manifestações são geralmente mais sutis do que infecções bacterianas nos mesmos locais. Ambos os fatores contribuem para longos atrasos no diagnóstico, especialmente em pacientes com osteomielite vertebral. Os principais sintomas da artrite por *Candida* são dor e diminuição da amplitude de movimento, enquanto a dor local é o sintoma predominante da osteomielite por *Candida* (GAMALETSSOU et al., 2012).

As infecções por *Candida* no sistema nervoso central geralmente afetam as meninges (embora sejam geralmente incomuns). Isso acontece mais frequentemente em bebês prematuros. A infecção pode ser secundária à disseminação hematogênica ou inoculação direta. Os fatores predisponentes incluem neurocirurgia, antibióticos mais recentes e corticosteroides. Febre, meningismo, pressão do líquido cefalorraquidiano elevada e sinais neurológicos localizados estão frequentemente presentes. *Candida albicans* parece ser a espécie mais patogênica, levando ao aumento das taxas de mortalidade na infecção invasiva quando comparada a outras espécies de *Candida* (SHOHAM; NUCCI; WALSH, 2011; WEITKAMP; NANIA, 2007).

A endocardite fúngica representa 1-6% do espectro total da endocardite. A endocardite por *Candida* é uma das manifestações mais graves de candidíase e é a causa mais comum de endocardite fúngica (MAMTANI et al., 2020). Devido à raridade da endocardite infecciosa por *Candida*, o prognóstico, a epidemiologia e o tratamento ideal da endocardite infecciosa por *Candida* não foram descritos de forma suficiente. Os procedimentos de terapia são obtidos principalmente a partir de séries de casos de um único local e relatos de casos. A endocardite por *Candida* resulta de candidemia e geralmente é observada em pacientes com válvulas cardíacas protéticas, pessoas que injetam drogas intravenosas e em pacientes que têm cateteres venosos centrais permanentes e fungemia prolongada (BADDLEY et al., 2008).

Candida albicans (e outras leveduras) pode causar infecções nosocomiais, que envolvem a transmissão pelas mãos de profissionais de saúde ou material contaminado

(por exemplo, lavagem do cateter venoso central com solução salina usada para vários pacientes) (PAPPAS et al., 2018; AUTHOR et al., 2015). Desafios críticos no tratamento de candidemia e candidíase invasiva incluem prevenção, detecção precoce e início rápido de terapia antifúngica sistêmica apropriada. O início prematuro do tratamento pode resultar em piores resultados clínicos (LOGAN; MARTIN-LOECHES; BICANIC, 2014; CALANDRA et al., 2016).

O surgimento de resistência a antifúngicos é um problema novo globalmente, que é uma preocupação adicional no tratamento de infecções causadas por *C. albicans* e outras *Candida* spp (BEARDSLEY et al., 2018; WIEDERHOLD, 2017; COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020). Os dados publicados sugerem que a profilaxia antifúngica com fluconazol reduz a incidência de candidíase invasiva entre pacientes de UTI de alto risco (SIDDHARTHAN; KARAKOUSIS; CHECKLEY, 2016). No entanto, deve-se ter em mente que a profilaxia antifúngica pode favorecer o desenvolvimento de resistência (WIEDERHOLD, 2017).

A profilaxia antifúngica direcionada é garantida em receptores de alto risco do fígado, pâncreas, intestino delgado ou células-tronco hematopoiéticas (ESCHENAUER et al., 2015). O controle da fonte de infecção e o início precoce do tratamento com terapia antifúngica sistêmica eficaz, geralmente antes da confirmação do diagnóstico de candidíase invasiva, é crucial para o sucesso do tratamento da candidíase invasiva (HSU et al., 2018). O controle da fonte refere-se à remoção da fonte de infecção, como a remoção de cateteres intravasculares contaminados, drenagem de líquido peritoneal, líquido pleural ou abscessos (CIUREA et al., 2020; BADIEE, 2013).

Para tratar a infecção com sucesso, às vezes é necessário remover dispositivos protéticos infectados, como marca-passo, articulação artificial ou outros dispositivos protéticos, se possível (COBO et al., 2017). Além de controlar a fonte de infecção, a terapia antifúngica eficaz precoce é crucial no tratamento bem-sucedido de pacientes com candidíase invasiva. Os dados indicam mortalidade significativamente maior quando a terapia antifúngica é atrasada ou inadequada ou quando o controle rápido da fonte não foi alcançado (PAPPAS et al., 2015; PAPPAS et al., 2018; PFALLER; CASTANHEIRA, 2016).

Várias diretrizes publicadas descrevem recomendações de especialistas para o tratamento de candidíase invasiva, com recomendações detalhadas para circunstâncias clínicas específicas (PAPPAS et al., 2015; TISSOT et al., 2017; BOW et al., 2010; WANG et al., 2019). A seleção de um antifúngico para o tratamento inicial deve ser baseada em testes prévios de uma cepa isolada de *C. albicans* para antifúngicos, na sensibilidade do

paciente ao agente antifúngico e na gravidade da doença, comorbidades relevantes e envolvimento cerebral, válvulas cardíacas ou órgãos internos. Unidades clínicas específicas também devem considerar dados sobre suscetibilidade a infecções de *Candida* spp. (PATTERSON et al., 2016; JOHNSON; PERFECT, 2010).

Os principais desafios terapêuticos das candidíases são a longa duração e a alta frequência de recaídas, sequelas e efeitos colaterais medicamentosos. Como para diversas outras infecções fúngicas, o tratamento medicamentoso para as candidíases persiste como desafio não totalmente resolvido. Para tanto, há a necessidade de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos, bem como terapias alternativas ou complementares às existentes (GAO et al., 2020).

Uma terapia alternativa que tem sido indicada para o tratamento de infecções localizadas (bacterianas e fúngicas) com resistência aos antibióticos convencionais, nos últimos anos, é a Terapia Fotodinâmica (TEGOS et al., 2008; ROSA et al., 2015; HAJIN; SALIH; RASSAN, 2010; RAMOS et al., 2016).

2.6 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) refere-se à destruição molecular por luz visível na presença de um fotossensibilizador (Fs). Quando irradiado, por uma luz visível de comprimento de onda adequado e na presença de oxigênio celular, leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), as quais resultam em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo, causando a morte do microrganismo que se encontra ligado ao Fs (PERUSSI, 2007).

Para que a terapêutica tenha eficácia, são necessários três componentes essenciais: a presença de um fotossensibilizador (endógeno ou exógeno), uma fonte de luz adequada ao fotossensibilizador e a presença de oxigênio molecular. O Fs deve ser biologicamente estável e eficaz fotoquimicamente, ou seja, tenha características fotofísicas favoráveis, como alto rendimento quântico de formação de tripletes, de oxigênio singlete e pequena constante de supressão destes. Além disso, que possua absorção na janela fototerapêutica (600-800 nm); seja solúvel em meio fisiológico, o que facilitará a aplicação da droga; tenha farmacocinética favorável e fácil eliminação pelo organismo, evitando fotossensibilidade prolongada; deve apresentar o mínimo de toxicidade para as células normais; deve ser inerte na ausência de luz; e a sua administração deve ser localizada (BONNETT; MARTINEZ, 2001; UCHOA; BAPTISTA, 2007).

Esta terapia possui vantagens e especificidade elevada, principalmente devido à aplicação exata da luz, à natureza relativamente não invasiva e a menor quantidade de efeitos secundários (VAN RIJT; SADLER, 2009). A produção de ERO's depende da concentração do Fs usado na TFD, da dose de luz irradiada e da localização do Fs no tecido-alvo (TOREZAN; NIWA; FESTA, 2009).

Deter o conhecimento quanto às diversas características da TFD no combate a patologias que provocam micoses sistêmicas proporciona resultados ainda mais satisfatórios no que tange seu tratamento. Dentre as peculiaridades destacam-se o domínio da técnica quanto as concentrações do fotossensibilizador a ser utilizado, o conhecimento sobre a espécie do microrganismo, distinguir períodos de pré-irradiação, fonte de luz e doses empregadas (JUNQUEIRA et al., 2010).

O desenvolvimento de resistência por microrganismos à TFD é um evento improvável de ocorrer, uma vez que esta é considerada um processo típico de interação multialvo. Esta é uma das diferenças entre a TFD e a maioria dos agentes antifúngicos convencionais. Numerosos estudos demonstraram que TFD é altamente eficaz na destruição de fungos *in vitro* (LAMBRECHTS; AALDERS; MARLE, 2005; LYON et al., 2011; FREIRE et al., 2015).

A TFD tem atuado como uma terapia emergente na eliminação de microrganismos patogênicos, incluindo isolados clínicos resistentes às drogas (COSTA et al., 2011). A resistência microbiana aos antifúngicos é um fenômeno em crescimento, o que faz da TFD uma ferramenta promissora, uma vez que ela induz danos na membrana, no DNA e nas mitocôndrias (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; MIMA et al., 2012).

2.6.1 Mecanismos de ação

A TFD combina um Fs e uma fonte de luz para induzir uma reação fototóxica, no processo de indução da morte celular. O oxigênio molecular, presente no tecido biológico, é convertido em espécies reativas de oxigênio (ERO's), os quais desencadeia uma cascata de reações fotooxidativas desencadeando o processo fotodinâmico. Durante a TFD, a luz emitida da fonte, em comprimento de onda adequado, irá excitar o Fs, o qual gerará dois tipos de reações, o tipo I e o tipo II (figura 9). Na reação de tipo I, ocorre a transferência de elétrons entre o Fs e as moléculas biológicas, resultando na produção de radicais livres, tais como superóxidos, hidroperóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As reações do tipo II são resultantes de uma transferência de energia, a qual leva à excitação do Fs para um estado tripleto (GAD; ZAHRA; FRANCIS, 2004; BALTAZAR et al.,

2013). O oxigênio singlete é um poderoso oxidante que reage com vários componentes celulares, resultando em dano celular, tais como a necrose ou a apoptose (PLAETZER et al., 2009; OBSTOY et al., 2016).

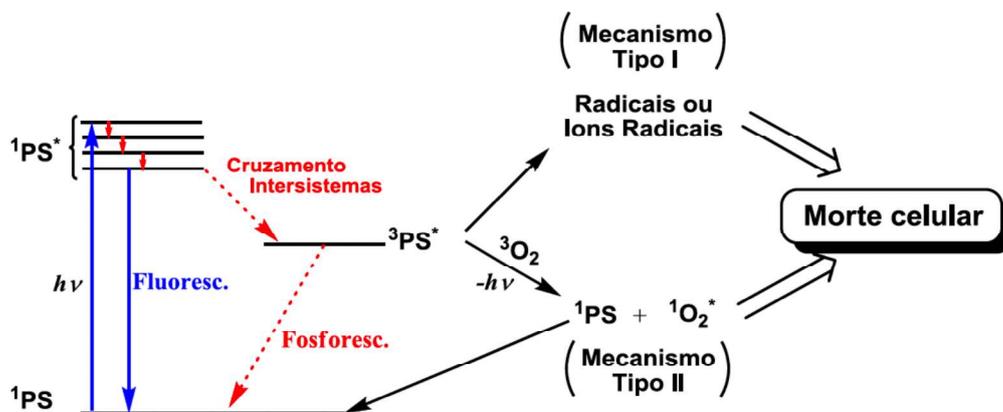


Figura 9 – Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas por luz.

Fonte: Oliveira et al., 2015.

Moléculas reativas de oxigênio causam danos irreparáveis aos componentes celulares, levando à morte celular. A escolha da fonte de luz deve ser baseada na banda de absorção do Fs. Por outro lado, a eficácia clínica de TFD depende da dosimetria complexa, a qual está associada com fatores como dose total de luz ou tempo de exposição à luz, e modo de entrega da luz (AGOSTINIS; BERG; CENGE, 2011; MACIEL et al., 2016).

O mecanismo de inativação do fungo na TFD é completamente diferente do que à associada com agentes antifúngicos. A TFD produz radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, tal como o oxigênio singlete (1O_2), o que conduz ao dano celular, à lise da membrana e à inativação de proteínas. Embora a maioria dos agentes antifúngicos iniba a biossíntese de ergosterol, principal lipídio nas membranas dos fungos, as espécies reativas de oxigênio, geradas por TFD, promovem danos na parede celular e na membrana. Isto permite que o Fs se transloque para dentro da célula. Uma vez no interior da célula, as espécies oxidantes geradas pela excitação da luz causam fotodanos às organelas celulares internas e, por consequência, a morte celular (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; MACIEL et al., 2016).

A análise das ERO's e das espécies reativas de nitrogênio (ERN's) geradas após a TFD reforça a afirmação de que, independente do microrganismo, a TFD reduz a viabilidade

celular de uma forma não específica, impedindo o surgimento de cepas resistentes a essa modalidade de tratamento (CALZAVARA et al., 2012; BALTAZAR et al., 2013; 2015).

2.6.2 Fotossensibilizadores

As espécies de fotossensibilizadores são categorizadas por algumas estruturas básicas, tais como porfirina, clorina, cianina e outros corantes (azul de toluidina, azul de metileno, azul de dimetileno, rosa bengal e hipericina). Fs também podem ser divididos em diferentes gerações de acordo com as suas capacidades funcionais, sendo primeira e segunda geração. Ainda há uma terceira geração em estudo, considerados fotossensibilizadores de segunda geração modificados e vinculados a portadores de drogas e outras moléculas (BASKARAN; LEE; YANG, 2018).

Vários estudos foram realizados nas últimas décadas com o objetivo de melhorar a eficácia e seletividade dos fotossensibilizadores. Alguns deles se concentraram no desenvolvimento de Fs que absorvam energia em maiores comprimentos de onda, permitindo uma penetração mais profunda de fontes de iluminação e, assim, atingindo tecidos mais profundos. Outros para melhorar a entrega e interação com sistemas biológicos. Idealmente, espera-se que um Fs tenha a capacidade de se acumular preferencialmente no tecido alvo e ser eliminado rapidamente do tecido normal (ORMOND; FREEMAN, 2013).

Os fotossensibilizadores de primeira geração, incluem geralmente Fs baseados em porfirinas, que foram apresentados para tratamento em escala comercial na década de 1970. As desvantagens dos fotossensibilizadores de primeira geração forçaram a necessidade de investigação de novos compostos e iniciaram o desenvolvimento dos fotossensibilizadores de segunda geração (KWIATKOWSKI et al., 2018)

A 2ª geração de fotossensibilizadores surgiu para tentar amenizar alguns problemas que a 1ª geração apresentava como: prolongada sensibilidade cutânea, baixa seletividade pelo tecido tumoral e a fraca banda de absorção onde a droga é fotoativada, não se encontrando na região ideal do espectro, região do vermelho (RIBEIRO et al., 2007).

Assim para os novos fotossensibilizadores, algumas características devem estar presentes para ser eleito um fotossensibilizador de 2ª geração: possuir baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, características fotofísicas favoráveis, simplicidade na formulação, farmacocinética favorável, facilidade de análise total dos componentes da fórmula, alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A clorina é considerada um fotossensibilizador de segunda geração promissor, que surgiu em meados dos anos 90, junto com a descoberta da era da resistência microbiana. É pertencente a classe de substâncias terrapirrólicas, sendo derivada da porfirina, possuem um de seus anéis pirrólicos na forma reduzida o que provoca uma alteração na simetria da molécula assim como na sua conjugação (RIBEIRO et al., 2007). Possui uma forte absorção na região do vermelho no espectro UV-Visível devido ao deslocamento da sua banda Q (PÉREZ-LAGUNA et al., 2017).

As clorinas são uma classe de substâncias tetrapirrólicas, normalmente resultantes das porfirinas por saturação de uma dupla ligação na periferia do sistema macrocíclico. Apesar das porfirinas e clorinas terem muitas semelhanças, a redução de um anel pirrol provoca uma alteração na simetria da molécula assim como na sua conjugação, dando origem a alterações de grande importância para as aplicações destas substâncias em TFD (GALEZOWSKI; GRYKO, 2007)

Quando comparadas com as propriedades espectroscópicas das porfirinas, as clorinas possuem um deslocamento para a região do vermelho no espectro de UV-Vis da última banda Q, assim como, um aumento o coeficiente de extinção molar desta banda. Esta característica faz com que as clorinas absorvam fortemente na região do azul e do vermelho do espectro de UV-Vis, enquanto as porfirinas absorvem fortemente na zona do azul, fazendo com que a cor das porfirinas seja vermelha e a das clorinas verde. Esta importante característica dos fotossensibilizadores de 2ª geração, faz com que as clorinas ganhem maior destaque no cenário da TFD (BOSE; DUBE, 2008).

Como fotossensibilizadores que absorvem luz em comprimentos de onda muito longos, as clorinas podem eventualmente ser muito empregadas no tratamento de tumores altamente pigmentados. Devido ao fato de serem formas reduzidas das porfirinas, existe a possibilidade das clorinas se oxidarem no processo, razão pela qual normalmente apresentam substituintes volumosos ou anéis exocíclicos junto ao anel reduzido, que origina este processo oxidativo (GALEZOWSKI; GRYKO, 2007; STOCKERT et al., 2007).

2.6.3 MCHC-Clorina

Entre os Fs mais promissores para aplicação em TFD pode-se destacar as clorinas, por absorverem luz em comprimentos de onda de alta penetração no tecido e apresentarem baixa toxicidade. No entanto, a agregação consta ser um fator inconveniente e comum nos Fs. Devido à ampla nuvem eletrônica e planaridade destes macrocíclicos aromáticos ocorre

interação entre as nuvens π . Esta interação ($\pi \rightarrow \pi$) desabilita o estado excitado por níveis vibracionais.

A MCHC-Clorina foi obtida pela primeira vez em 2011, por uma rota sintética específica. A figura 10 apresenta a imagem de raio-x da MCHC-Clorina (UCHOA et al., 2011).

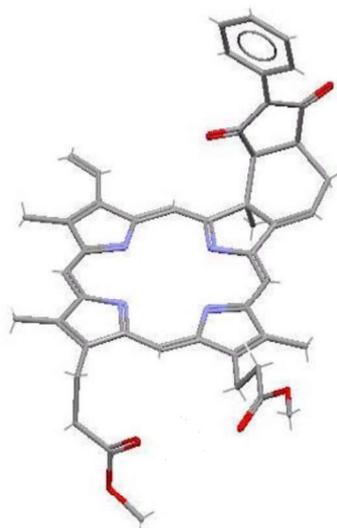


Figura 10 – Projeção de raio-X para a MCHC-Clorina

Fonte: Uchoa et al., 2011.

A rota estabelecida em 2011 possibilitou a obtenção do primeiro fotossensibilizador não planar, e conseqüentemente, isento de auto-agregação. É importante lembrar que a auto-agregação desabilita o estado excitado, reduzindo assim os rendimentos quânticos de tripleto, oxigênio singleto e fluorescência. Sendo assim, a MCHC-Clorina está livre das interações $\pi \rightarrow \pi$, interações estas que desativam o estado excitado por fatores vibracionais. Além de apresentar fotofísica maximizada para TFD, a MCHC-Clorina apresenta estruturas mono funcionalizáveis e assimétricas, que viabilizam cruzarem membranas lipídicas. Por apresentar estas características, é esperado que esta estrutura também expresse efeitos fotobiológicos maximizados (UCHOA et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar os fatores envolvidos na ação fotodinâmica *in vitro* sobre leveduras de *Candida albicans*, utilizando o fotossensibilizador MCHC-Clorina.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o fotossensibilizador MCHC-Clorina;
- Determinar as propriedades fotofísicas deste composto;
- Estudar a permeabilidade deste fotossensibilizador em leveduras de *Candida albicans*;
- Avaliar a citotoxicidade do composto em leveduras do fungo escolhido;
- Observar a ocorrência de fototoxicidade na ausência e presença do fotossensibilizador.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e metodologias aplicadas:

- **Ressonância Magnética Nuclear (RMN):** Os espectros de RMN foram determinados em um equipamento BRUKER 500MHz e em um Varian 300MHz e inspecionados com a ajuda do *software* Mestre-C (versão 5.0).
- **Espectrofotômetro (UV-Visível):** Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-240-PC) em cubetas de quartzo com caminhos ópticos de 0,4 e 1,0cm e as densidades óticas do microrganismo em estudo foram obtidas através de um espectrofotômetro Micronal (B 582) em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0cm.
- **Equipamento de detecção de oxigênio singlete por emissão no Infravermelho Próximo:** O oxigênio singlete foi caracterizado através do seu decaimento no infravermelho próximo (a 1270nm) e o espectro de emissão registrado de 1200 a 1320nm.
- **Agitador orbital:** as amostras depositadas nas placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano utilizadas para o estudo do fotossensibilizador foram agitadas durante 05 minutos em agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil).
- **Câmara de fluxo laminar:** foi utilizada durante a manipulação do microrganismo.
- **Microscópio de Fluorescência Confocal LSM 510 (Zeiss):** foi utilizado para captura das imagens de internalização do fotossensibilizador.
- **Sistema Diodo Laser:** Como fonte de luz foi utilizado um equipamento diodo laser da marca LASERLine, modelo PLD-1/50, com comprimento de onda de 660nm, operando a uma potência de 50mW, área de emissão de 0,04cm² em dose de 100J (figura 11).

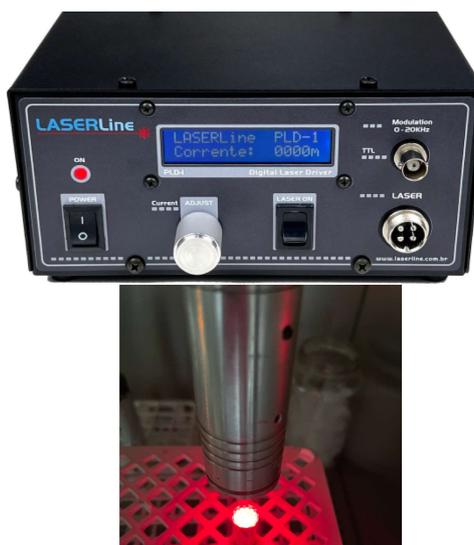


Figura 11 – Sistema Diodo Laser, modelo PLD-1/50.

Fonte: LASERLine.

A caracterização estrutural foi determinada por RMN de ^1H e ^{13}C , os espectros foram registrados em um espectrômetro tipo Bruker 500 a 513MHz e 125,77MHz. Os espectros foram obtidos em CDCl_3 (Aldrichi ou Acros) utilizando TMS como referência interna. Os deslocamentos estão determinados em partes por milhão (ppm): δ .

Os espectros de massa foram obtidos com alta resolução (quatro casas decimais) por injeção direta em elétron spray, em um MicroTOF Ic Bruker Daltonics, Capillary: 4000V, Nebulizer.

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-240-PC) em cubetas de quartzo com caminhos óticos de 0,1 e 1,0cm.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex (Fluorolog 0,81m) em modo ângulo reto, com as 4 fendas (2 de excitação e 2 de emissão) ajustadas com aberturas em 5mm. A excitação foi realizada em 500nm, com absorção ajustada para valores menores que 0,1.

O oxigênio singlete foi caracterizado através do seu decaimento no infravermelho próximo (a 1270nm) e espectro de emissão registrado de 1200 a 1320nm. A quantificação foi realizada através dos transientes de emissão em 1270nm, em um equipamento composto por um laser Nd-YAG Continuum Surelite III pulsado em 532nm, com tempo de duração de pulso de 5ns e energia $\leq 5\text{mJ/pulso}$; um monocromador e uma fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu modelo R5509 resfriada a -80°C ; um sistema de detecção composto por uma placa de aquisição rápida modelo Becker & Hickl GmbH MSA – 300. O sistema foi montado pela *Endinburg Analytical Instruments*.

4.2 Síntese:

Síntese de Maleimidas:

A uma solução de 3mg (0,03mol) de anidrido maleico em 40,0mL de éter etílico, em banho de gelo, adicionou-se 3mol de anilina dissolvida em éter etílico. O precipitado formado, o ácido amiânico, foi filtrado a vácuo e lavado com éter etílico. Uma solução de 0,24g (0,0014mol) de acetato de sódio anidro e 30ml de anidrido acético foi preparada e deixada em banho de óleo ($\cong 60^{\circ}\text{C}$) seguido da adição do ácido amiânico obtido da reação de adição da amina ao anidrido maléico. A reação foi acompanhada por TLC. Após o término, $\cong 12$ horas, a maleimida resultante foi precipitada em água e gelo, com intensa agitação, em seguida foi filtrado a vácuo e lavado com água. Após a secagem o produto foi purificado em coluna, usando sílica gel (230-70mesh) como suporte e diclorometano/acetato de etila como fase móvel. Após a cromatografia a maleimida foi cristalizada e caracteriza por RMN ^1H e ^{13}C e massa de alta resolução.

Síntese das Clorinas:

A Clorina foi sintetizada a partir de fenilmaleimida e Protoporfirina IX dimetil ester (Pp IX Ester), através da reação de Diels–Alder em um reator selado, usando tolueno anidro como solvente, e atmosfera inerte. O sistema foi mantido em banho de óleo por um período de 12 horas a 120°C . A reação foi monitorada por TLC e UV-Vis em 666nm (banda de clorina). Após o término a reação foi purificada em coluna cromatográfica com sílica gel (Across 0,060-0,200mm 60Å) usando $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 25:1 como fase móvel. Por este processo foi isolado o produto, e recuperado o excesso de reagentes. O produto da reação, dois isômeros (A e B), foram separados por TLC preparativa em placas de 20cm (0,2mm de diâmetro) de sílica gel marca Across, 2-25 μm 60 A, usando $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$. 25:1 como fase móvel. A caracterização dos isômeros em clorinas de anel A e anel B, foi realizada de forma inequívoca por RMN 1D (^1H , ^{13}C e DEPT 135). Todos os produtos obtidos foram caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução, por injeção direta em eletro spray.

4.3 Caracterização estrutural:

Fenimaleimida: rendimento global de 74% e Espectro RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz), δ (ppm): 6.84 (s br, H-2, H-3 vinyl group); 7.33-7.38 (m, H-7, H-8 e H-9); 7.45-7.48 (m, H-6 e H-10). NMR ^{13}C (CDCl_3 , 125.77 MHz) δ (ppm): 126.03 (2C, C-6 e C-10); 127.93 (C-8); 129.11 (2C, C-7 e C-9); 131.17 (c-5); 134.16 (2C, C-2 e C-3) e 169.47 (2C, C-1 e C-

4). HPLC-MS, m/z para C₁₀H₇NO₂ calculada em 174.0550 foi determinada em 174.0582. O pico base em 206.0827 é referente a abertura do anel imida, e a adição de metanol durante o processo de análise.

Clorina A: ¹H NMR (CDCl₃, 500.13 MHz) δ (ppm): -2.47 e -2.37 (br s, 2H, H-22 e H-24), 2.07 (s, 3H, CH₃-2⁵), 3.15 (t, 2H, J=7.5 Hz, H-13²), 3.20 (t, 2H, J= 7.7 Hz, H-17²), 3.40 (s, 3H, CH₃-12¹), 3.45–3.48 (m, 2H, 2^{3a} e 2^{3b}), 3.49 (s, 3H, CH₃-18¹), 3.56 (s, 3H, CH₃-7¹), 3.64 (s, 3H, OCH₃-13⁴), 3.68 (s, 3H, OCH₃-17⁴), 3.92 (m, 1H, H-2²), 4.17 (t, 1H, J=7.8 Hz, H-13¹), 4.29 e 4.30 (2dt, 1H, J=7.8 e 4.4 Hz, H-17^{1a} e 17^{1b}), 4.65 (d, 1H, J=8.5 Hz, H-2¹), 6.14 (dd, 1H, J=11.5 e 1.3 Hz, H-8^{2a}), 6.34 (dd, 1H, J=17.5 e 1.5 Hz, H-8^{2b}), 6.66-6.70 (m, 2H, 2⁹ e 2¹³) 6.94-6.97 (m, 3H, 2¹⁰, 2¹¹ e 2¹²) 7.41 (t, 1H, J=4.9 Hz, H-2⁴), 8.18 (dd, 1H, J=17.7 e 11.5 Hz, H-8¹), 9.10 (s, 1H, H-20), 9.33 (s, 1H, H-5), 9.67 (s, 1H, H-15), 9.85 (s, 1H, H-10).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77 MHz) δ (ppm): 11.40 (C-12¹), 11.65 (C-18¹), 12.30 (C-7¹), 21.50 (C-17²), 21.89 (C-13²), 25.62 (C-2³), 26.50 (C-2⁵), 36.57 (C-17²), 37.03 (C-2²), 38.54 (C-13²), 50.10 (C-2¹), 51.63 (C-13⁴), 51.77 (C-17⁴), 52.31 (C-2), 90.48 (C-5), 93.41 (C-20), 97.94 (C-15), 99.79 (C-10), 115.64 (C-2⁴), 121.27 (C-8²), 130.99 (C-31), 173.40 (C-13³), 173.77 (C-17³), 174.85 (C-7²), 178.60 (C-2⁶).

Clorina B: ¹H NMR (CDCl₃, 500.13 MHz) δ (ppm): -2.42 (br s, 2H, H-21 e H-23), 2.07 (s, 3H, CH₃-2⁵), 3.16 (t, 2H, J=7.5 Hz, H-12²), 3.20 (t, 2H, J=7.5 Hz, H-8²), 3.41 (s, 3H, CH₃-13¹), 3.47 (m e s, colocado sobre, 5H: 2^{3a}, 2^{3b} e CH₃-7¹), 3.60 (s, 3H, CH₃-17¹), 3.64 (s, 3H, OCH₃-12⁴), 3.65 (s, 3H, OCH₃-8⁴), 3.93 (td, 1H, J=8.0 e 3.0 Hz, H-2²), 4.18 (t, 2H, J=7.5 Hz, H-12¹), 4.32 (t, 2H, J=7.5 Hz, H-8¹), 4.65 (d, 1H, J=8.5 Hz, H-2¹), 6.10 (dd, 1H, J=11.5 e 1.1 Hz, H-18^{2a}), 6.32 (dd, 1H, J=17.5 e 1.1 Hz, H-18^{2b}), 6.67-6.99 (m, 2H, 2⁹ e 2¹³), 6.94-6.96 (m, 3H, 2¹⁰, 2¹¹ e 2¹²), 7.42 (t, 1H, J=5.0 Hz, H-2⁴), 8.12 (dd, 1H, J=17.5 e 11.5 Hz, H-18¹), 9.27 (s, 1H, H-5), 9.28 (s, 1H, H-20), 9.69 (s, 1H, H-10), 9.75 (s, 1H, H-15).

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77 MHz) δ (ppm): 11.25 (C-18¹), 11.66 (C-12¹), 12.39 (C-2¹), 21.59 (C-13¹), 21.90 (C-17¹), 25.62 (C-7³), 26.63 (C-7⁵), 36.68 (C-13²), 37.05 (C-17²), 38.61 (C-7²), 50.11 (C-7¹), 51.65 (C-17⁴), 51.75 (C-13⁴), 52.25 (C-7), 90.01 (C-10), 94.24 (C-5), 98.39 (C-15), 99.36 (C-20), 115.99 (C-7⁴), 120.90 (C-3²), 125.99 (C-7⁸ e C-7¹³), 128.06 (C-7¹⁰), 128.51 (C-7¹⁰ and C-7¹²), 129.89 (C-3¹), 130.44 (C-3), 173.34 (C-13³), 173.37 (C-17³), 174.69 (C-7⁶), 178.56 (C-7⁷).

4.4 Partição 1-octanol/água:

Foram misturados volumes iguais de 1-octanol e tampão fosfato 10^{-2} mol/L⁻¹, pH= 7,02 (mesmo pH do meio de cultivo de célula) e agitados vigorosamente por 20 minutos e separados, para que ambas as fases apresentassem saturação mútua. Foram preparados, para cada clorina, 5mL de uma solução com absorvância $\cong 1$ na banda Soret (400nm) em 1-octanol saturado com tampão; esta solução foi agitada vigorosamente por 2 horas com volume igual do tampão fosfato. Decorrido este período, esta foi centrifugada a 4000rpm por 10 minutos e foi determinada a absorção de ambas as fases na banda de 666nm. Para a obtenção do logaritmo de partição 1-octanol/tampão ($\log P_{O/A}$).

4.5 Internalização do Fotossensibilizador:

A internalização do fotossensibilizador Clorina B, foi determinada através da microscopia de fluorescência confocal. Para este ensaio foi preparada uma suspensão de *C. albicans* (ATCC 60196). O microrganismo foi reativado em Ágar Sabouraud dextrose, e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a levedura foi cultivada em caldo Sabouraud. Em seguida, o cultivo foi centrifugado a 3000rpm durante 3 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) e centrifugado novamente a 3000rpm durante três minutos, sendo este procedimento repetido por três vezes, para a remoção do meio de cultivo. Em seguida a levedura foi ressuspensa em solução fisiológica de maneira que fosse obtida uma suspensão concentrada. Esta suspensão foi incubada em solução fisiológica com o fotossensibilizador na concentração de 1 μ M da Clorina B num período de 10 minutos. Decorrido este período a suspensão foi lavada com solução fisiológica para que a clorina não internalizada fosse eliminada. Para obtenção das imagens foi preparado um esfregaço delgado com a suspensão em uma lâmina de microscopia, sobre a qual foi colocada uma lamínula. A clorina foi excitada em 410nm e a emissão foi registrada no intervalo de 640 a 690nm. Para captura das imagens foi utilizada microscopia de Fluorescência Confocal LSM 510 da Zeiss com objetiva de 100 vezes.

4.6 Cultivo e suspensão de *Candida albicans*

Foram reativadas cepas de *C. albicans* ATCC 60196, obtidas da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA. Estas estavam armazenadas no Laboratório de Micologia e Bioensaios da UFOPA. A reativação foi realizada primeiro em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA, KASVI®) e

posteriormente em meio de cultivo meio líquido Triptecaseína de Soja (TSB, KASVI®) e incubadas por 24 horas em temperatura de 30° C. Após o tempo de incubação, foi realizado a preparação do inóculo fúngico de acordo com a escala de mcFarland nº 0,5. Realizou-se diluições seriadas até 10⁻³mL em solução salina a 0,5%. Posteriormente o inóculo foi cultivado em solução derivada de clorina, MCHC-Clorina, preparada pela solubilização do composto em álcool etílico na concentração estoque de 1mg/mL, no qual o volume de 50µL do fotossensibilizador foi diluído em meio TSB para posterior ação fotodinâmica, totalizando a concentração do fotossensibilizador em 5,6µmol.

4.7 Estudos da ação fotodinâmica

A ação fotodinâmica foi realizada utilizando-se delineamento experimental inteiramente casualizado com seis grupos: três controles, para verificar viabilidade do inóculo e composto, assim como comparação com fármaco de escolha; e três grupos testes, reproduzidos em seis ciclos com intervalos de cinco minutos, realizados em triplicata. As amostras foram divididas nos seguintes grupos: grupo 1, composto pelo meio TSB e a clorina; grupo 2, composto pelo meio TSB e o fungo; grupo 3 (L-F+), não recebeu irradiação, mas teve Fs na composição; grupo 4 (L+F-), recebeu irradiação laser, mas não teve Fs na composição da amostra; e grupo 5 (L+F+), exposto à irradiação e teve Fs em sua composição. O grupo 6 (controle positivo), foi o grupo de comparação com a droga antifúngica Anfotericina B.

Para receber a irradiação as amostras foram preparadas em eppendorf's. O volume final de cada amostra contida no eppendorf foi de 1150µL, dessa forma, o grupo 1 foi constituído de 1100µL de TSB e 50µL de clorina; o grupo 2 com 1050µL de TSB e 100µL da terceira diluição (10⁻³) do fungo *C. albicans*; os grupos 3 e 5 foram constituídos de 1000µL de TSB, 100µL do fungo (10⁻³) e 50µL do Fs; e o grupo 4 com 1050µL de TSB e 100µL do fungo (10⁻³). Para o controle positivo de ação do fármaco, utilizou-se Anfotericina B (Cristália®), na concentração de 3,13µg/mL (CLSI, 2003), como descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Composição das amostras divididas nos respectivos grupos experimentais.
Fonte: Dados do autor, 2023.

Grupo	Composição
1	1100µL de TSB + 50µL de Fs
2	1050µL de TSB + 100µL de fungo
3 (L-F+)	1000µL de TSB + 100µL de fungo + 50µL de Fs
4 (L+F-)	1050µL de TSB + 100µL de fungo
5 (L+F+)	1000µL de TSB + 100µL de fungo + 50µL de Fs
6 (Anf B)	1000µL de TSB + 100µL de fungo + 50µL de Anf B

Os grupos 1 e 2 eram grupos controles, apenas para verificar a esterilidade do composto e viabilidade do fungo, respectivamente, portanto, não receberam qualquer tipo de tratamento. Já o grupo 6 era controle positivo, para comparação dos resultados com a ação do fármaco Anfotericina B. Após a preparação, as amostras dos grupos 3 e 5, que continham clorina em sua composição, permaneceram por quinze minutos incubadas, obedecendo o tempo de pré-irradiação, necessário para que o Fs pudesse aderir à parede celular e viabilizar a entrada da luz no interior da célula fúngica. Posteriormente, as amostras dos grupos 4 e 5 foram irradiadas com a fonte de luz diodo laser com comprimento de onda de 660nm. A irradiação ocorreu por períodos de cinco minutos contínuos, perfazendo seis ciclos, totalizando trinta minutos de irradiação, sendo que a cada ciclo, foi colhida uma alíquota de 50 μ L a qual foi semeada em placa de Petri, em triplicata, previamente preparada. Estas foram mantidas em estufa, a 36°C, por sete dias, nas quais posteriormente foi realizada a contagem do número de UFC/mL formadas.

4.8 Tratamento dos dados

As variáveis numéricas foram tabuladas em plataforma Excel (Microsoft Office). Posteriormente, foram analisadas por testes estatísticos como Shapiro-Wilk test e Kolmogorov-Smirnov test, considerados testes paramétricos que confirmaram a distribuição normal dos dados; Two-Way Anova test para comparação geral das amostras; e o Dunnett's test para múltiplas comparações, utilizando o software GraphPad Prism 8.0. O nível de significância adotado foi de 95% com valor fixado em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Síntese dos dienófilos (maleimidas):

Fenilmaleimida foi sintetizada em duas etapas: 1) a adição da amina ao anidrido maleico para a formação do ácido amiânico correspondente, e 2) refluxo em anidrido acético para a ciclização do anel imida. Este procedimento foi realizado segundo processo descrito na literatura, ilustrado na figura 12, com rendimento de 70%.

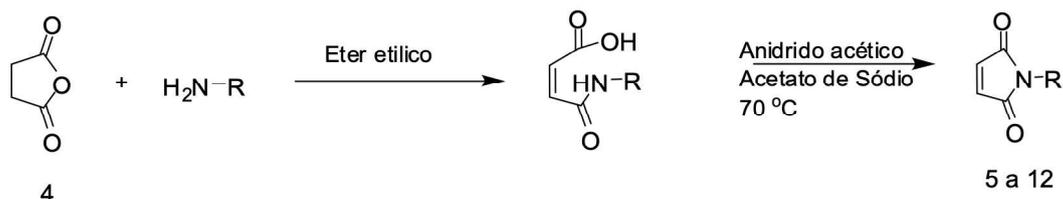


Figura 12 – Esquema para obtenção da fenilmaleimida.

Fonte: Cava et al., 1973.

O produto foi caracterizado por RMN ¹H e ¹³C, e por HPLC-massa em alta resolução por infusão direta, sendo determinada a massa exata em 174,0582 para o íon molecular da fenilmaleimida. Já o pico base em 206,0827 é referente a abertura do anel imida, e a adição de metanol durante o processo de análise.

A MCHC-Clorina foi obtida pela primeira vez por Uchoa A.F. et al em 2011 (JOC 2011), através da ciclo adição (4 + 2) -reação de Diels–Alder. Este processo oferece como inovação a obtenção de compostos com estruturas rígidas.

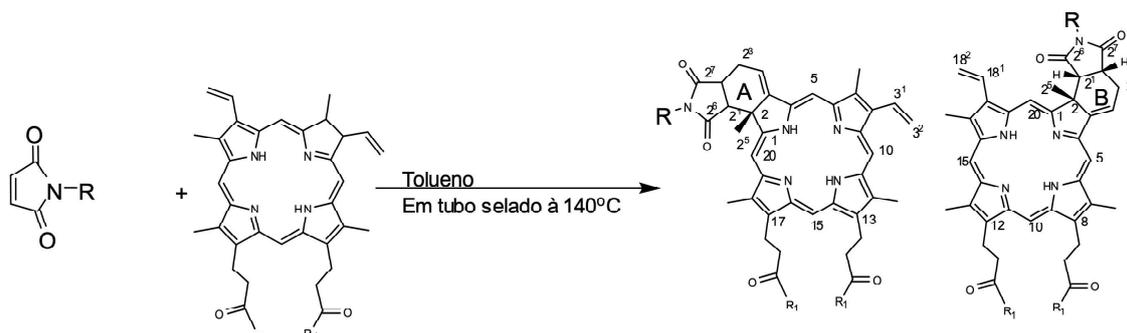


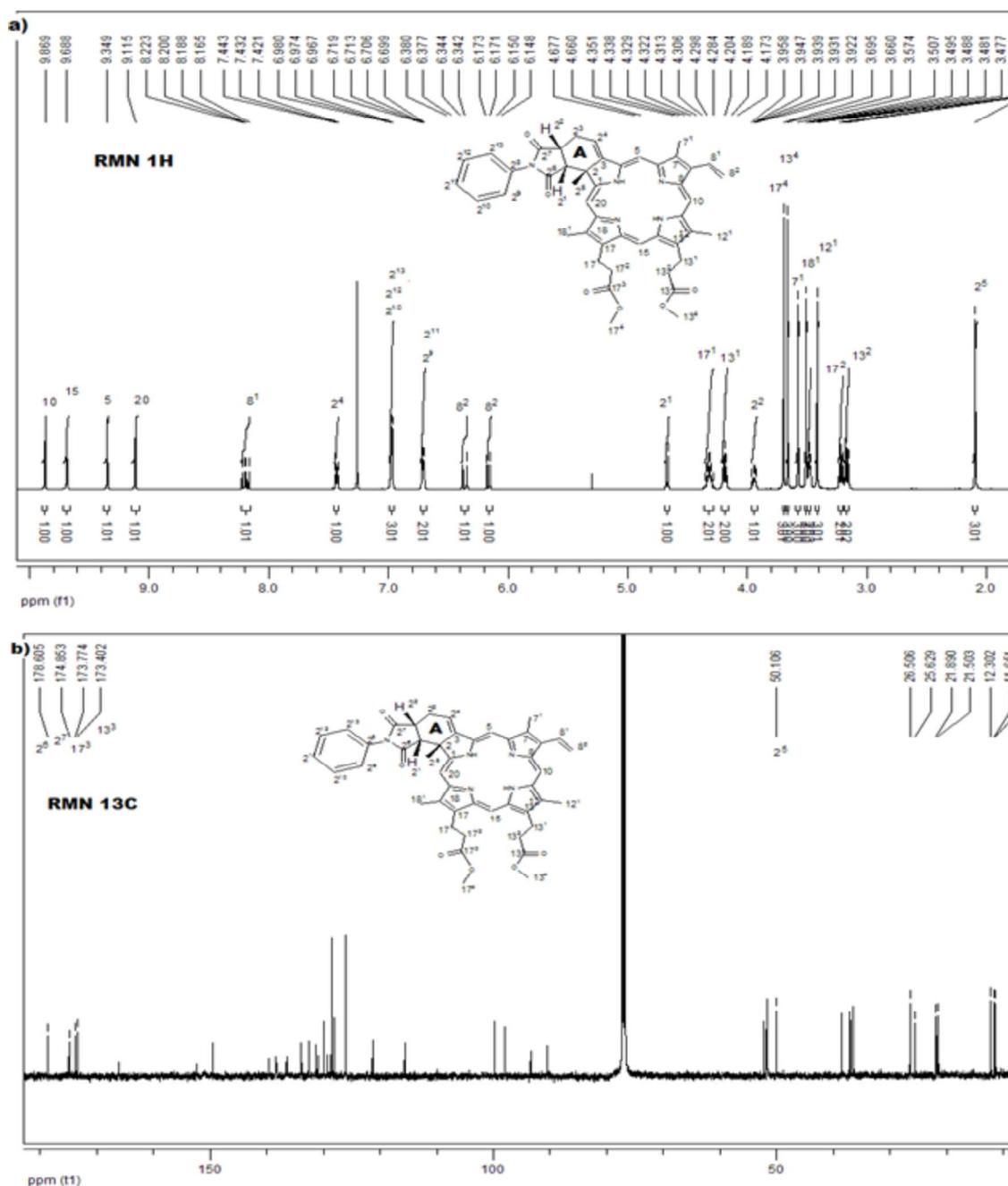
Figura 13 - Rota de obtenção da MCHC-Clorina A e B.

Fonte: Uchoa et al., 2011.

5.2 Obtenção da fenilclorinas:

Os compostos (clorina de anel A) e (clorina de anel B) foram obtidos pelo processo ilustrado na figura 13, purificados por cromatografia em coluna usando gel de sílica como

suporte oferecendo um rendimento global de 72%. Os isômeros foram separados por TLC preparativa. A técnica oferece uma perfeita separação das clorinas de anel A e B. Em ambas as técnicas, foram utilizadas como fase móvel, clorofórmio/acetato de etila nas proporções 25:1. A Clorina A isolado na mancha inferior, com Rf de 0,38. A caracterização estrutural foi realizada de forma inequívoca por RMN 1D (^1H e ^{13}C) massa de alta resolução, HPLC-massa. Os espectros de ^1H e ^{13}C são apresentados na figura 14.



A Clorina de anel B foi isolada na mancha superior e apresenta Rf de 0,54. A caracterização estrutural foi realizada de forma análoga a do anel A, por RMN 1D (^1H e ^{13}C) e massa de alta resolução, HPLC-massa. Os espectros de ^1H e ^{13}C são apresentados na figura 15.

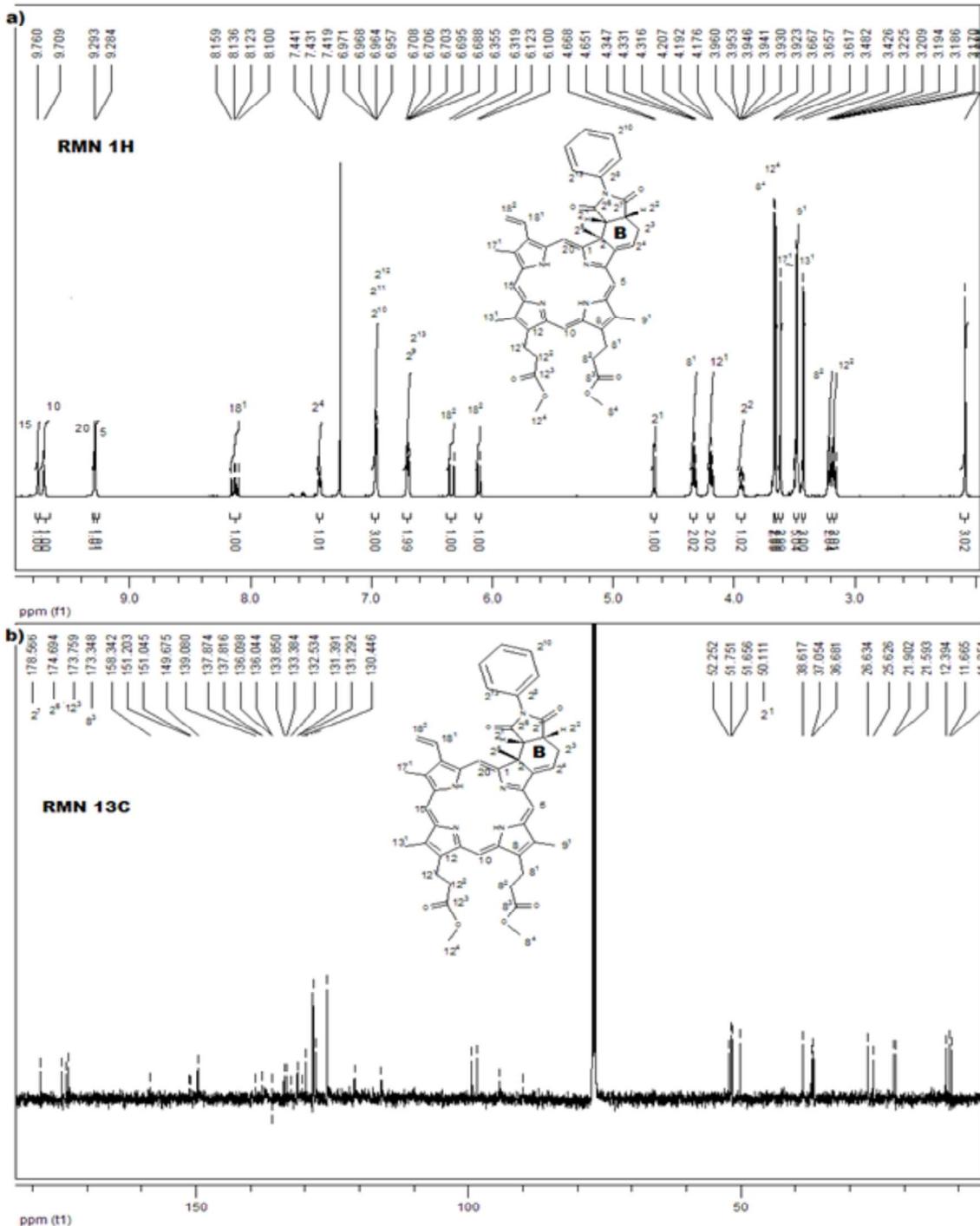


Figura 15 - Espectros de RMN em CDCl_3 para o composto [13B]

a) ^1H a 500.13 MHz em CDCl_3

b) ^{13}C a 125.77 MHz

Fonte: Dados do autor, 2023.

5.3 Propriedades Físicas e Fotofísicas

5.3.1 Espectros UV-Vis e emissão fluorescente

Os espectros UV-Vis e emissão fluorescente foram determinados para ambos os compostos em clorofórmio e em metanol. As curvas espectrais são coincidentes para ambos os compostos, tanto no espectro de absorção (UV-Vis) quanto no espectro de emissão (fluorescência). O espectro de absorção está apresentado no gráfico 1, já o espectro de emissão fluorescente está apresentado no gráfico 2.

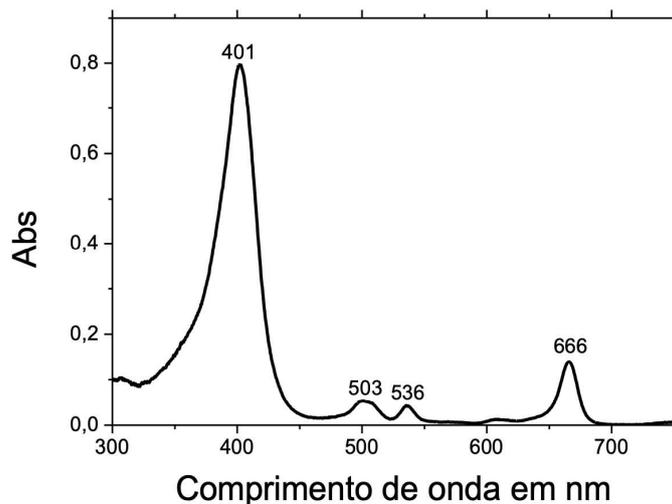


Gráfico 1 – Espectro por UV-Vis da MCHC-Clorina obtido em metanol.

Fonte: Dados do autor, 2023.

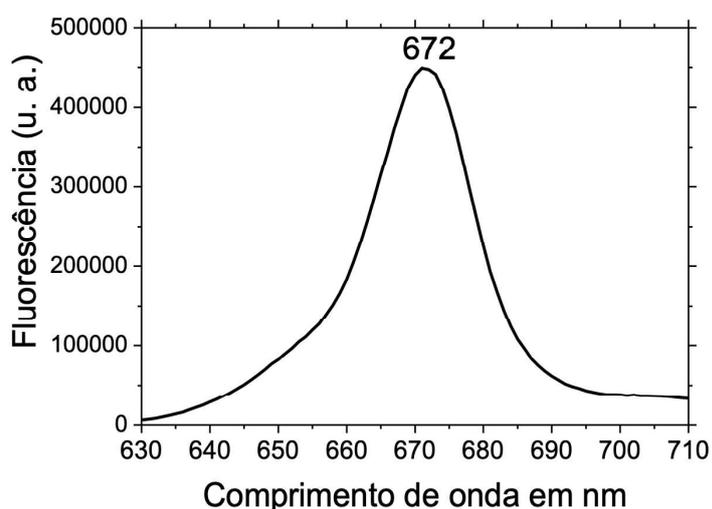


Gráfico 2 - Espectro de emissão fluorescente da MCHC-Clorina obtido em metanol.

Fonte: Dados do autor, 2023.

5.3.2 Emissão de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

A determinação da emissão de $^1\text{O}_2$ foi realizada em soluções $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1. Para a quantificação, foi tomado como referência o oxigênio singlete gerado pela fotoexcitação de azul de metileno, um excelente fotossensibilizador, e que apresenta o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) bem estabelecido para este solvente (REDMOND; GAMLIN, 1999). Os transientes de emissão das amostras e do padrão, foram obtidos por excitação do composto em 532nm, nas mesmas condições experimentais (laser, densidade óptica, solvente e aberturas de fendas). A geração do oxigênio singlete foi confirmada pela observação do seu espectro de emissão característico. O gráfico 3 mostra o espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pela clorina A.

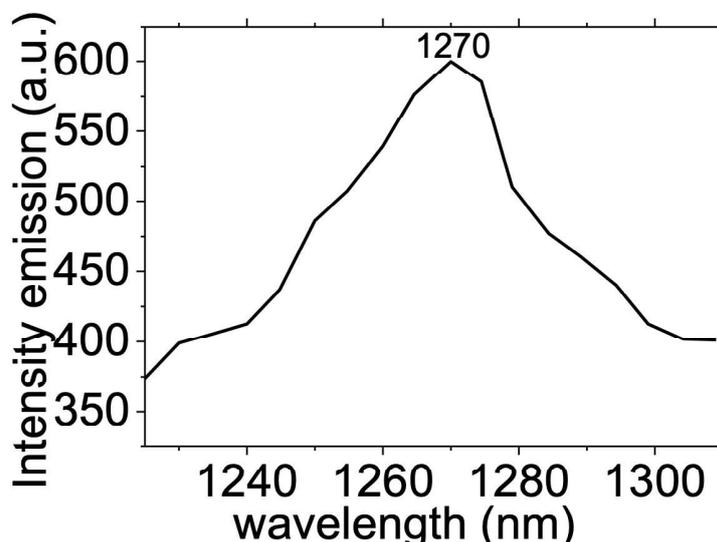


Gráfico 3 - Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$, obtido por fotoexcitação do composto 13A.

Fonte: Dados do autor, 2023.

O espectro apresenta um máximo em 1270nm característico de $^1\text{O}_2$. O tempo de vida da espécie ($^1\text{O}_2$) é outra forma de caracterização e foi determinado por ajuste exponencial da curva de decaimento (gráfico 4), que está coerente com o tempo de vida esperado para $^1\text{O}_2$ nesta mistura de solventes $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1.

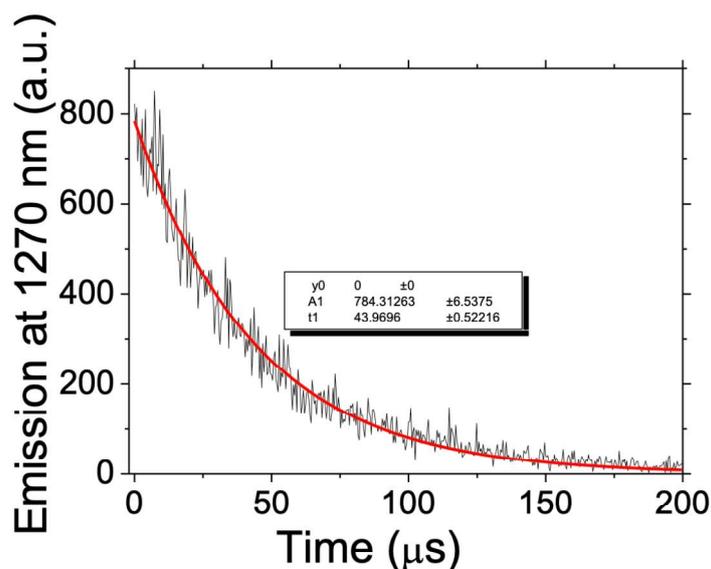


Gráfico 4 - Transiente de decaimento de $^1\text{O}_2$, obtido por fotoexcitação da clorina A.

Fonte: Dados do autor, 2023.

Os resultados mostrados para Clorina A (gráficos 3 e 4) foram análogos aos obtidos para a Clorina B. Estes resultados oferecem uma caracterização inequívoca da espécie, que foi formada por transferência de energia do estado triplete das novas clorinas, para o oxigênio molecular dissolvido na solução, mostrando a potencialidade destes compostos como fotossensibilizadores.

Para ambas clorinas (A e B), assim como para o padrão, os transientes foram obtidos em triplicatas, e calculados a média aritmética, para determinação do rendimento quântico (Φ_{Δ}) de oxigênio singlete, apresentado no gráfico 5.

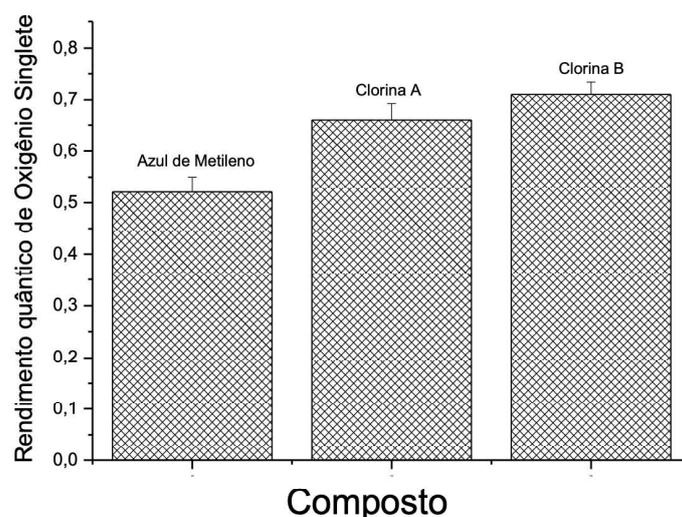


Gráfico 5 - Rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, determinado para os compostos clorínicos.

Fonte: Dados do autor, 2023.

Para a quantificação foi tomando como referência o extremo inicial do transiente, $T=5\mu\text{s}$ (próximo instante de excitação do laser), obtido numa escala de tempo reduzida ($0,05\mu\text{s}$). Estes sinais foram usados para a determinação do rendimento quântico de geração do $^1\text{O}_2$ por fotoexcitação dos compostos. Tendo como rendimento quântico de oxigênio singlete $0,66 \pm 0,032$ para a Clorina A e $0,71 \pm 0,024$ para a Clorina B, é importante mencionar que estes valores não divergem pela margem de erro. Mostrando apenas uma tendência superior para o isômero B. Estes valores estão apresentados no gráfico 5.

Também foi comprovado que ambos apresentam rendimento quânticos superiores aos determinados para o padrão azul de metileno. Estes resultados, diferem dos apresentados na literatura para a vectroporfirina e clorinas anfífilicas, onde o rendimento quântico da clorina de anel B é a metade do apresentado para a clorina de anel A.

O Φ_{Δ} é considerado de magnitude elevada, mostrando que a principal via de desativação destes fotossensibilizadores é por colisão com oxigênio molecular. A soma das desativações é representada pela equação 1. Quando somadas, as duas principais vias de desativação do estado excitado destas moléculas (fluorescência e colisão com O_2), e subtraímos essa soma de 1 (equação 2), observamos que os outros possíveis decaimentos são de proporção reduzida. A soma de $\Phi_f + \Phi_{\Delta}$ aproxima-se de 1.

$$\Phi_{\Delta} + \Phi_f + \Phi_{others} = 1 \quad \text{Equação 1}$$

$$\Phi_{others} = 1 - \Phi_{\Delta} - \Phi_f \quad \text{Equação 2}$$

Estes fatores são justificáveis devido à alta rigidez destas clorinas que, para algumas moléculas, apresenta outros decaimentos desprezíveis.

5.3.3 Partição 1-octanol/água

O coeficiente de partição 1-octanol/água é um parâmetro físico-químico utilizado para estimar a afinidade de moléculas por uma membrana celular. O gráfico 6 apresenta os resultados expressos na forma logaritmo ($\log P_{o/a}$) para as clorinas A e B.

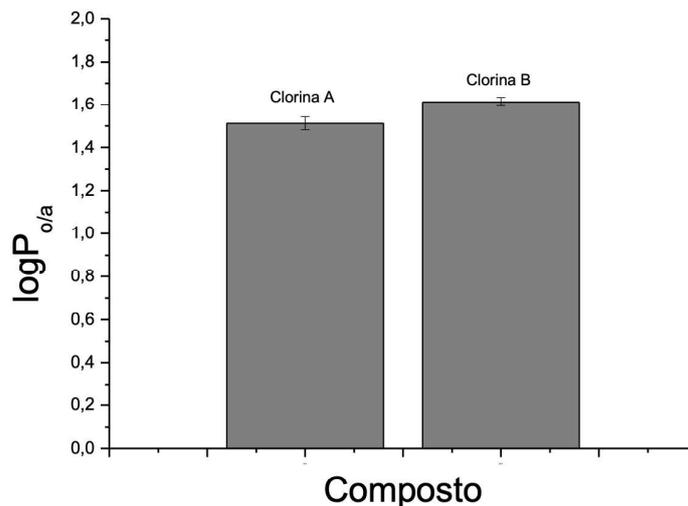


Gráfico 6 - Coeficiente de partição 1-octanol/água expresso em logaritmo ($\log P_{o/a}$) das clorinas A e B.

Fonte: Dados do autor, 2023.

Ambas clorinas apresentam solubilidade similares em ambas as fases, determinando que estes compostos apresentam um caráter anfifílico, possibilitando-os de interagirem com membrana celular e tecido. Como sítio polar, estas moléculas apresentam as imidas, que possivelmente poderiam realizar ligação de hidrogênio em ambas carbonilas e no nitrogênio. Já os grupos éster, não acrescentam solubilidade apreciável em água para estruturas relacionadas, porfirinas e clorinas.

Como descrito na literatura, macrocíclicos aromáticos apresentam solubilidade limitada, isto ocorre principalmente devido às interações $\pi \rightarrow \pi$, muito intensas, que superam as interações ente o soluto e o solvente. Os compostos em estudos, apresentam alta solubilidade em solventes de diferentes polaridades, desde diclorometano até água, aqui determinado por $\log P_{o/a}$. Estes altos índices de solvatação, não comuns para moléculas relacionadas, podem ser justificados por fatores conformacionais, uma vez que os anéis clorínicos e maleimidas encontram-se em posição axial, as nuvens eletrônicas estão impedidas de interação cofacial, e as carbonilas do anel imida estão expostas, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio com solventes polares próticos. Tais dados já são confirmados por cristalografia de raio-x em Uchoa et al., 2011.

5.3.4 Internalização do Fotossensibilizador

Os ensaios de internalização em *Candida albicans*, com a Clorina B foram determinados de forma preliminar por imagens de microscopia de fluorescência, onde foi

observado a fluorescência característica da MCHC-Clorina na região de 640 a 690nm. Já o espectro de fluorescência do composto apresenta máximo em 672nm, tal como apresentado no gráfico 2. A figura 16 mostra a imagem de fluorescência do composto na levedura.

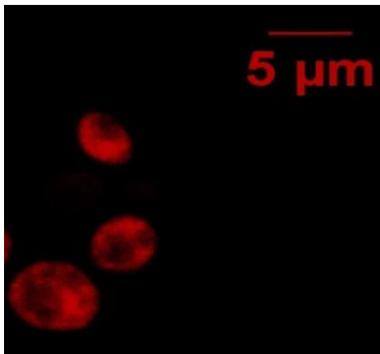


Figura 16 - Microscopia de fluorescência *Candida albicans* incorporada com MCHC-Clorina na região de 640 a 690nm com excitação em 410nm, obtido por Microscópio de Fluorescência Confocal LSM 510 (Zeiss) com objetiva 100x, em condições de não confocalidade.

Fonte: Dados do autor, 2023.

Pode-se observar pela morfologia de *Candida albicans*, que a fluorescência na região de 640 a 690nm está distribuída por toda região, denotando que o composto apresenta excelente permeabilidade nesta levedura.

5.4 Testes de esterilidade, viabilidade e da ação fotodinâmica

Para verificar a esterilidade do fotossensibilizador e a viabilidade do fungo, a clorina foi diluída junto ao meio TSB (grupo 1) e a *C. albicans* foi diluída no meio TSB (grupo 2), respectivamente. No grupo 1 não foi observado crescimento fúngico, diferente do grupo 2, onde houve formação de colônias, como observados nas figuras 17 e 18.



Figura 17 – Grupo controle 1 (meio TSB + clorina). Ausência de unidades formadoras de colônias verificada pelo teste de esterilidade do fotossensibilizador junto ao meio TSB.

Fonte: Dados do autor, 2023.



Figura 18 – Grupo controle 2 (meio TSB + *C. albicans*). Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas ao teste de viabilidade do fungo junto ao meio TSB.

Fonte: Dados do autor, 2023.

A quantidade de UFC's contabilizada nas placas de Petri foi transformada em log de base 10^3 para conferência das médias e aplicação dos testes estatísticos.

O grupo 3 (L-F+) obteve uma média de UFC/mL de 5,980 e desvio padrão de 0,587; o grupo 4 (L+F-) obteve média de 6,169 com desvio padrão de 0,559; e o grupo 6 (Anfotericina B) obteve média de 4,987 com desvio padrão de 0,543. Os três grupos foram comparados com o grupo 5 (L+F+), que obteve média de 4,513 e desvio padrão de 1,355.

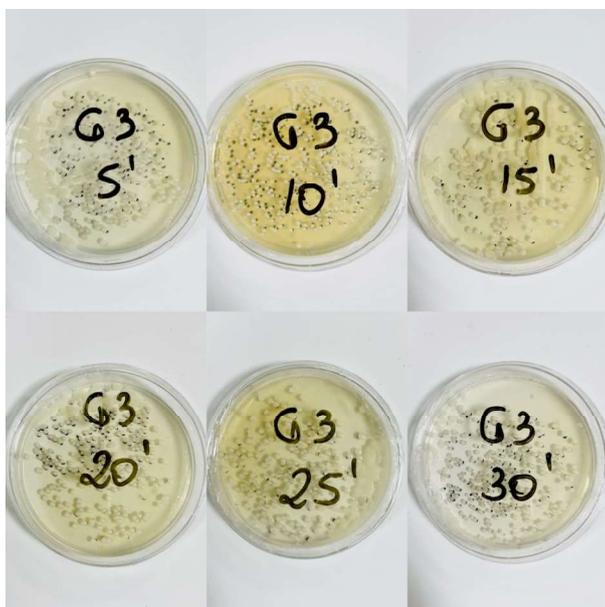


Figura 19 – Grupo 3 (meio TSB + Clorina + *C. albicans*). Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas após o teste de citotoxicidade da MCHC-Clorina, a uma concentração de $5,6\mu\text{mol}$, quando incubada em solução contendo *Candida albicans*.

Fonte: Dados do autor, 2023.

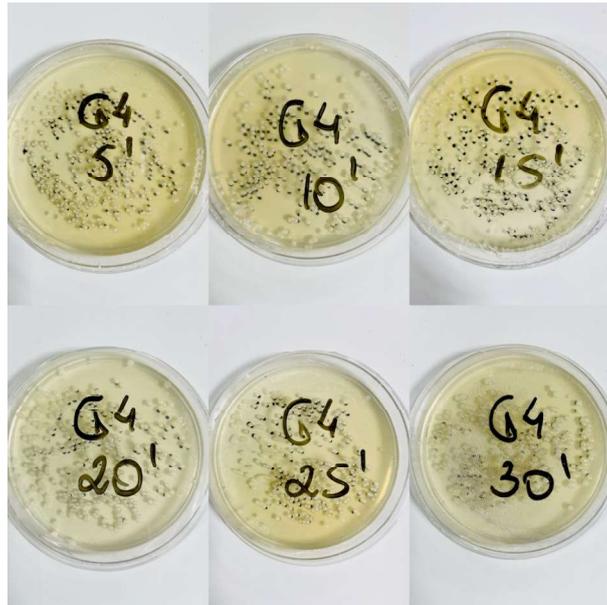


Figura 20 – Grupo 4 (meio TSB + *C. albicans* + Laser). Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas no teste de fototoxicidade, quando leveduras de *Candida albicans* foram irradiadas com laser à 660 nm na ausência de fotossensibilizador exógeno.

Fonte: Dados do autor, 2023.

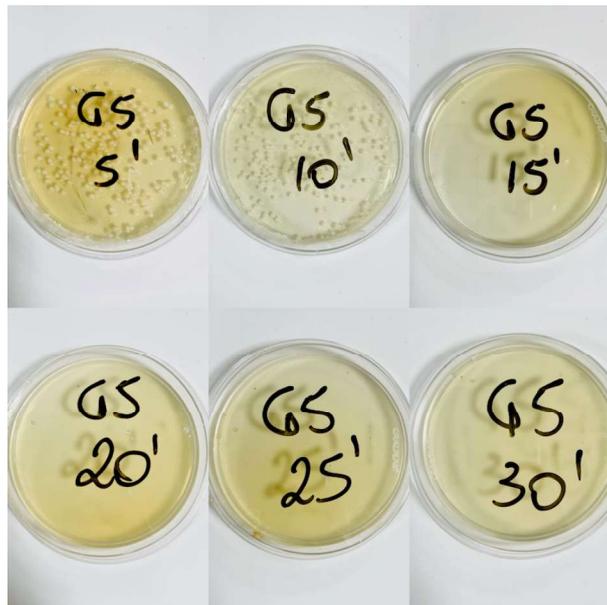


Figura 21 – Grupo 5 (meio TSB + *C. albicans* + Clorina + Laser). Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) obtidas após a irradiação de suspensão contendo *Candida albicans* + MCHC-Clorina, a uma concentração de $5,6\mu\text{mol}$, em álcool etílico, com laser 660 nm.

Fonte: Dados do autor, 2023.



Figura 22 – Grupo controle 6 (meio TSB + *C. albicans* + Anfotericina B). Unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) após teste de ação do fármaco Anfotericina B (Cristália®), na concentração de 3,13 µg/mL, quando incubado em solução contendo *Candida albicans*.

Fonte: Dados do autor, 2023.

A tabela 2, baseada nos testes estatísticos ANOVA e DUNNETT, nos quais os grupos 3, 4 e 6 foram comparados com o grupo 5, evidencia que os dois grupos experimentais (G3 e G4) são estatisticamente diferentes do grupo 5, apresentando $p < 0,0001$.

Já o grupo 6 (Anfotericina B) não apresentou diferença estatisticamente significativa, em nenhum dos testes aplicados.

Tabela 2 - Comparação entre as médias em Log (UFC/mL) dos 2 grupos experimentais utilizados nos ensaios com fungo *C. albicans* e o grupo controle positivo em relação ao grupo 5.

Fonte: Dados do autor, 2023.

Grupo	Média ± Desvio Padrão	Teste ANOVA	Teste DUNNETT
G3: L-F+	5,980 ± 0,587	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
G4: L+F-	6,169 ± 0,559	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
G5: L+F+	4,513 ± 1,355	-	-
G6: Anf B	4,987 ± 0,543	$p = 0,507$	$p = 0,102$

No gráfico 7 observa-se a média de unidades formadoras de colônias descrita em logaritmo, nos três protocolos experimentais (G3, G4 e G5) e no grupo controle positivo (G6), desconsiderando o tempo de aplicação da TFD.

É possível perceber que a redução logarítmica é mais acentuada no grupo 5, que quando comparado aos demais grupos testes (G3 e G4) possui diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Entretanto, ao ser comparado ao grupo controle positivo (G6), não se observa significância estatística.

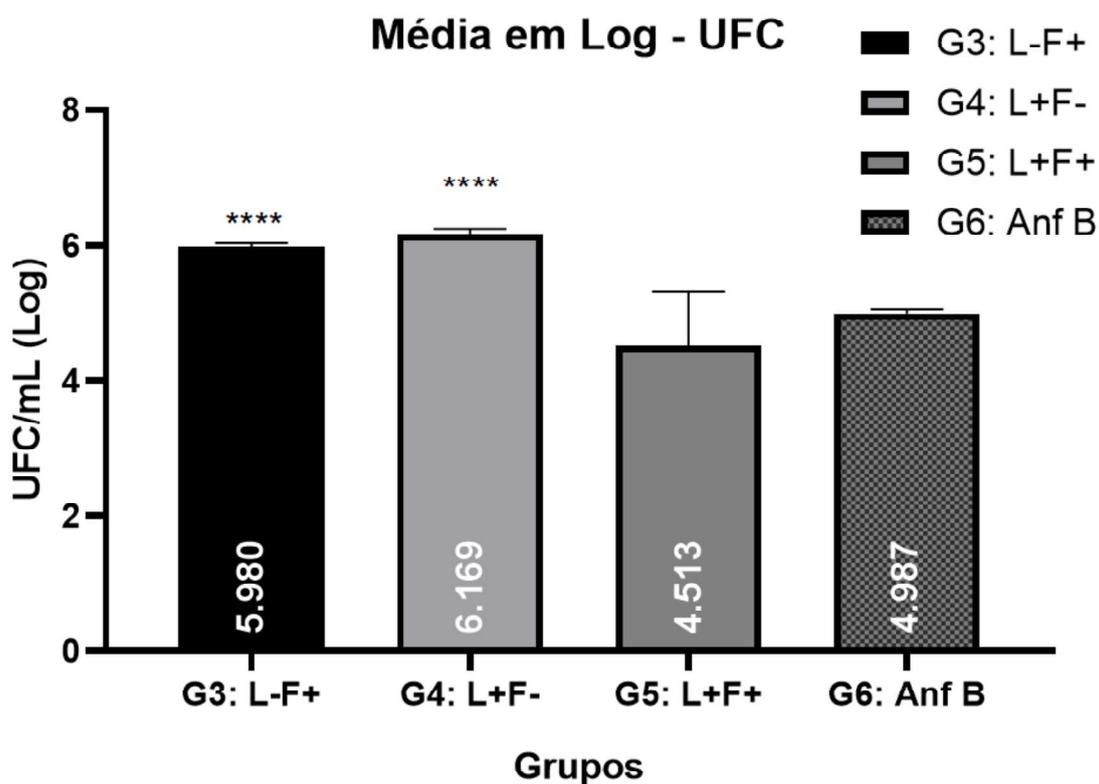


Gráfico 7 - Representação gráfica da distribuição dos resultados logarítmicos de UFC/mL segundo os grupos experimentais. Os asteriscos representam a significância na comparação com o grupo 5 (L+F+) (**** $p < 0,0001$).

Fonte: Dados do autor, 2023.

No gráfico 8, observa-se a evolução logarítmica em função do tempo de exposição nos 3 protocolos experimentais (G3, G4 e G5) e no grupo controle positivo (G6). Todos os grupos tiveram suas médias de UFC analisadas em cada ciclo temporal de 5 minutos, totalizando 6 ciclos.

Os grupos 3, 4 e 6 mantiveram uma constância de UFC do 5º ao 30º minuto. No entanto, verificou-se uma acentuada redução no grupo 5 a partir de 10 minutos de irradiação laser, chegando a 0 UFC no tempo de 15 minutos, e se mantendo até o 30º minuto.

Médias de crescimento microbiano (em Log) em relação ao tempo

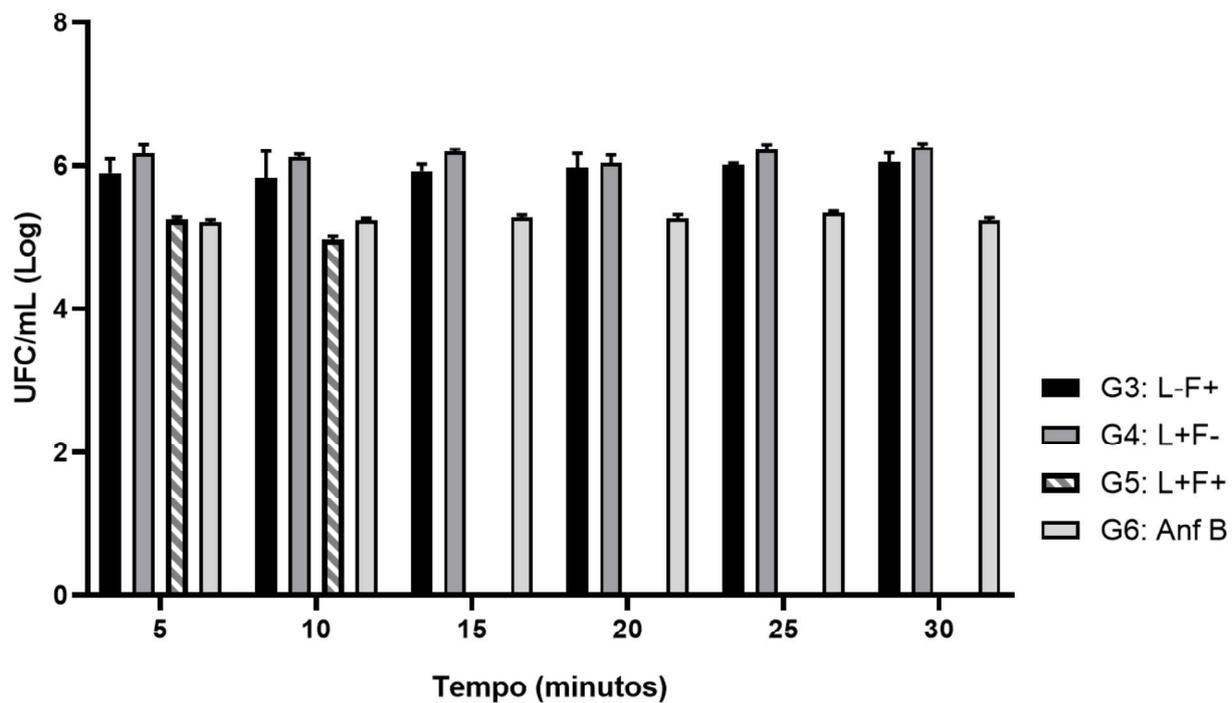


Gráfico 8 – Representação gráfica da distribuição dos resultados logarítmicos de UFC/mL segundo os grupos experimentais em função do tempo de exposição ao laser e do grupo controle 6.

Fonte: Dados do autor, 2023.

6. DISCUSSÃO

Teste de citotoxicidade da MCHC-Clorina

Partindo do princípio que descreve a ação da TFD em diversos microrganismos, neste estudo com *C. albicans*, foi utilizado o fotossensibilizador MCHC-Clorina, um novo composto derivado de clorina que, por ser de segunda geração, oferece resultados promissores.

Um dos ensaios deste estudo foi realizado com o intuito de determinar a toxicidade da MCHC-Clorina nas leveduras de *C. albicans*, identificado como o grupo 3 (L-F+). Utilizou-se para isso, o composto na concentração de 5,6 μ mol, objetivando identificar se a concentração seria tóxica ao fungo, quando não irradiada por uma fonte de luz, uma vez que o Fs não deve apresentar citotoxicidade na ausência de luz, já que não deveria haver formação de oxigênio singlete (CELLI et al., 2010; CHOI et al., 2015). Gao et al. (2020) relatam em seu estudo a síntese de novos derivados de clorina (I e II) caracterizadas com diferentes meios espectroscópicos. Os resultados mostraram que os compostos I e II tiveram um máximo de absorção em torno de 650nm, com coeficientes de extinção molar de $1 \times 10^{-4} \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$; tinham forte emissão de fluorescência em 650-660nm após excitação com luz 419-422nm; revelaram que o oxigênio singlete foi produzido após irradiação de compostos com luz de 650nm na presença de oxigênio molecular; e que a estrutura dos compostos I e II era estável.

Diversos estudos na literatura avaliaram a toxicidade de fotossensibilizadores na ausência de luz, relatando a ausência de efeitos citotóxicos (ZOLFAGHARI et al., 2009; KASHEF et al., 2012; VILELA et al., 2012). Em outro estudo com síntese de clorina, Moritz et al. (2017), desenvolveram um derivado anfifílico de clorina (CHL-T) que exibiu bandas de absorção na janela terapêutica e pequeno rendimento quântico de fluorescência; além de eficiente geração de oxigênio singlete e maior citotoxicidade para células tumorais, em comparação com células não tumorais em curto tempo de incubação, apresentando-se como um potencial fotossensibilizador para TFD. No estudo de Chen et al. (2017), que estudaram a síntese de três novos conjugados de clorina e6 para TFD em tumores em concentrações de até 100 μ M, os resultados dos experimentos *in vitro* mostraram alta fototoxicidade, mas relativamente baixa toxicidade no escuro.

Esses resultados corroboram com os achados no presente estudo, uma vez que

houve crescimento fúngico mesmo na presença do fotossensibilizador, denotando que a MCHC-Clorina isoladamente não é capaz de provocar inativação da *C. albicans*.

Ramos et al. (2014) realizaram um estudo a fim de verificar a ação fotodinâmica de seis fotossensibilizadores derivados de protofórfirina IX dissolvidos em DMSO na concentração estoque de 1mg/mL associados com emissão contínua de luz LED na redução do fungo *Trichophyton rubrum*, e observaram que a maioria dos Fs provocou redução das UFC's, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, considerando que o fotossensibilizador MCHC-Clorina, dissolvido em álcool etílico, também foi utilizado na concentração estoque de 1mg/mL que, após as diluições, foi obtida a concentração de 5,6µmol.

No estudo de Sales (2006), verificou-se que a TFD inibiu o crescimento de leveduras de *C. albicans* em 90% das amostras quando utilizado o azul de metileno nas concentrações de 0,05mg/mL e 0,1mg/mL. Todavia, não houve inativação total do fungo, o que difere do estudo de Ramos et al. (2014), que observou redução completa do fungo *T. rubrum* utilizando fotossensibilizadores na concentração estoque de 1mg/mL, concordando com os resultados deste estudo.

Testes de fototoxicidade

Tornou-se necessário, no desenvolvimento do presente estudo, verificar os efeitos causados pela aplicação da luz laser, com comprimento de onda de 660nm, na dose de irradiação de 100J, na ausência de Fs exógeno. Objetivou-se, dessa forma, obter-se resultados de aplicações isoladas da luz, para posterior comparação com os resultados obtidos em grupos, nos quais houve a combinação do Fs com o laser.

No presente estudo, no qual foi realizada a aplicação somente da luz laser, a 660 nm, sobre leveduras de *C. albicans*, grupo 4 (L+F-) não foi observada nenhuma redução significativa no número de UFC. Demonstrou-se, dessa forma, que não existiu uma relação direta com o tempo de exposição na dose de energia empregada.

Neste estudo verificou-se que no grupo 3, grupo tratado sem irradiação laser e que continha fotossensibilizador em sua composição, houve um crescimento de 5,980 UFC/mL, expressa em Log, evidenciando que apenas o uso do Fs sem a associação do laser não promove a inativação do fungo. Assim como no grupo 4, grupo tratado com irradiação laser sem apresentar Fs em sua composição, que também apresentou um crescimento de 6,169 UFC/mL, denotando que sem Fs a irradiação laser não provoca a inativação do fungo.

Rosa et al. (2015) utilizaram um laser de baixa potência, com comprimento de onda de 660 nm, porque essa fonte de luz vermelha (630-700 nm) é amplamente utilizada em TFD. Isto porque em razão dos seus comprimentos de onda relativamente longos, o laser pode, efetivamente, penetrar nos tecidos biológicos.

A literatura tem relatado que a interação entre essas fontes de luz e os Fs que absorvem este comprimento de onda, tais como os derivados de clorina, pode resultar em destruição microbiana significativa (PELOI et al., 2008). Rosa et al. (2015), a fim de determinar a atividade bactericida com a aplicação do laser de 660nm, submetem o microrganismo testado à luz laser isolada, utilizando-se os mesmos parâmetros aos utilizados nos grupos de TFD. Foram observadas reduções no número de UFC/mL de *Staphylococcus aureus* em relação ao controle, mostrando a existência de um pequeno efeito bactericida. Isso ocorre porque algumas células bacterianas e fúngicas são conhecidas por sintetizar níveis elevados de porfirinas endógenas, as quais atuam como Fs endógenos.

Hajin et al. (2010) também relataram resultados semelhantes, nos quais foi observada uma redução no número de UFC/mL de *Staphylococcus aureus* apenas com a aplicação do laser. Tais hipóteses, podem não estarem relacionadas aos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que não houve redução significativa no número de UFC de *C. albicans* quando as leveduras foram irradiadas pelo laser na dose de 100J.

Em outras pesquisas foram revelados resultados divergentes, em que a aplicação somente do laser não resultou em nenhuma diferença na redução microbiana, em comparação ao grupo controle, corroborando com os achados do presente estudo (PELOI et al., 2008; MIYABE et al., 2011).

A terapia laser de baixa potência apresenta propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e de biomodulação. O laser, em vários comprimentos de onda, é absorvido por cromóforos específicos em fungos, os quais podem induzir o estresse e a inibição de seu crescimento (VERMA et al., 2012). Por outro lado, o efeito fungicida tem sido atribuído ao laser pelo efeito bioestimulante, fototérmico ou efeito fotodinâmico, induzido por cromóforos endógenos presentes nos fungos (MAVER-BISCANIN et al., 2005).

Estes resultados são semelhantes com os observados no estudo de Almeida et al. (2012), que enfatizam que a TFD apenas apresenta efeito quando há interação da luz de comprimento de onda adequado com o fotossensibilizador já incorporado pela célula alvo.

A literatura descreve que os Fs não devem apresentar quaisquer efeitos citotóxicos na ausência de luz, devido ao fato de que as moléculas do Fs se encontram em seu estado

energético fundamental. No momento em que a luz em comprimento de onda específico é introduzida no sistema, a energia contida nos fótons é transferida para as moléculas do Fs, e isto faz com que estas moléculas fiquem excitadas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Entretanto, em nossos resultados verificou-se que no grupo 4, grupo que não continham Fs na composição das amostras, o valor das UFC/mL expresso em Log é maior que o valor do grupo 3, grupo composto com Fs, mostrando que a MCHC-Clorina, na concentração de 5,6 μ mol, oferece algum efeito citotóxico, sugerindo que o Fs pode ser capaz de interagir com as moléculas do meio, provocando a formação de radicais livres ou oxigênio singlete e, conseqüentemente, a apoptose de algumas células fúngicas (CHAVANTES, 2009; PERUSSI, 2007).

Estudos da ação fotodinâmica

Neste estudo foi observado que o grupo irradiado com laser e com presença de MCHC-Clorina, grupo 5, houve redução total das UFC's a partir do 15° minuto de irradiação laser, denotando que o fungo *Candida albicans*, foi inativado pela terapia. Este resultado está relacionado ao fato de que pode ter ocorrido a transferência de elétrons entre o fotossensibilizador ativado pela irradiação laser e os componentes da célula, promovendo a formação de radicais livres. Outra possibilidade também é que pode ter havido a formação de oxigênio singlete, o qual reage e agride os componentes da célula como lipídeos, proteínas e DNA. Ambos os mecanismos são capazes de induzir a inativação do microrganismo (BARREIROS et al., 2006; GANDRA et al., 2004).

Comparando os resultados obtidos nos grupos em que as leveduras de *C. albicans*, foram irradiadas com luz laser, na ausência de Fs exógeno, com os obtidos na presença da clorina, observou-se que os valores obtidos nos grupos de TFD foram mais eficazes aos observados somente com a irradiação do laser, sem a presença do Fs. Demonstrou-se, desta forma, a presença e a eficácia dos efeitos fotodinâmicos obtidos pela excitação da clorina, em suspensão contendo leveduras de *C. albicans*. Isto demonstra que a TFD consiste numa importante modalidade terapêutica para o tratamento de micoses induzidas por este patógeno.

Verificou-se neste estudo que houve crescimento fúngico nos dois grupos que não receberam a TFD, e que o grupo irradiado com laser na presença de MCHC-Clorina não houve proliferação fúngica, denotando que apenas na interação do fotossensibilizador com a luz visível é possível reduzir o crescimento microbiano.

Para comparação dos efeitos fotodinâmicos alcançados com a luz laser e o fotossensibilizador de escolha, foi testado um fármaco amplamente utilizado na prática médica com ação antifúngica, como a Anfotericina B (grupo 6). Neste ensaio, percebeu-se um crescimento discreto de UFC's, denotando que a droga é eficaz na inibição parcial da *C. albicans*, uma vez que, quando comparado ao grupo 5 (L+F+), não apresentou diferença estatisticamente significativa. No entanto, ainda foi notado crescimento de unidades formadoras de colônia, diferente do ensaio do grupo 5, que não houve crescimento a partir do 15º minuto de irradiação laser, elucidando que a TFD pode ser mais promissora que as drogas antifúngicas.

Diante dos resultados apresentados pelo presente estudo, subsidiou-se o entendimento dos mecanismos envolvidos na TFD, como: tempo de incubação pré-irradiação; concentração ideal não tóxica da clorina; e melhor compreensão da relação dose de energia/resultado. Acredita-se dessa forma, estar-se contribuindo com a popularização da TFD, como um importante tratamento alternativo das candidíases. Isto porque além de apresentar notável eficácia na redução de UFC/mL de *C. albicans*, a TFD possui outros atrativos como baixo custo, não apresenta efeitos colaterais e não desenvolve resistência por parte do microrganismo.

7. CONCLUSÃO

Partindo da análise dos resultados encontrados neste estudo, pode-se concluir que a Terapia Fotodinâmica associada à administração do fotossensibilizador MCHC-Clorina é capaz de promover a eliminação *in vitro* do fungo leveduriforme *Candida albicans*. A aplicação isolada da irradiação laser ou do fotossensibilizador não promoveu a morte do fungo *C. albicans*.

Não foi observada citotoxicidade do composto no escuro. Acredita-se que o Fs se encontrou ativo fotodinamicamente, levando a geração de $^1\text{O}_2$, culminando na morte das leveduras de *C. albicans*, submetidas à TFD, sendo que sua eficácia está relacionada diretamente à dose de energia empregada.

Foi verificada uma redução significativa no número de UFC das leveduras submetidas à dose de 100J, sendo essa a dosimetria ideal para essa terapêutica. Desta forma, essa terapia demonstrou ser uma importante alternativa no tratamento de candidíases.

Sugere-se a realização de mais pesquisas com a aplicação da TFD na redução do fungo *C. albicans* e ensaios *in vivo*, visto que se trata de um microrganismo que nos seres humanos pode provocar repercussões sistêmicas.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem J**, v. 473, n. 4, pp. 347–364, 2016. <https://doi:10.1042/BJ20150942>.
- AGUIAR, M.M.G.B. **Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Oral**. 2007.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- ALLERT, S.; FÖRSTER, T.M.; SVENSSON, C.M.; RICHARDSON, J.P.; PAWLIK, T.; HEBECKER, B.; RUDOLPHI, S.; JURASCHITZ, M.; SCHALLER, M.; BLAGOJEVIC, M.; et al. Candida albicans-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers. **MBio**, v. 9, n. 1, 2018.
- ALMEIDA, L.M.; ZANOELO, F.F.; CASTRO, K.P.; BORISSEVITCH, I.E.; SOARES, C.M.A.; GONÇALVES, P.J. Cell Survival and Altered Gene Expression Following Photodynamic Inactivation of Paracoccidioides brasiliensis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, pp. 992-1000, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01112.x>.
- ALMEIDA, S.M.; QUEIROZ, T.F.; TEIVE, H.A.; RIBEIRO, C.E.; WERNECK, L.C. Central nervous system paracoccidioidomycosis: clinical features and laboratory findings. **Journal Infection**, v. 48, n. 2, pp. 193-198, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2003.08.012>.
- ALSOMALI, M.I.; ARNOLD, M.A.; FRANKEL, W.L.; GRAHAM, R.P.; HART, P.A.; LAMHIMLIN, D.M.; NAINI, B.V.; VOLTAGGIO, L.; ARNOLD, C.A. Challenges to “classic” esophageal candidiasis: Looks are usually deceiving. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 147, n. 1, pp. 33–42, 2017.
- ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, pp. 319-327, 2007.
- ANDRADE, L.P.B. **Efeitos do Vinagre em Candida Albicans após aderência in vitro em Resina Acrílica Termicamente Ativada**. 2006. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2006.
- ASLANI, N.; JANBABAEI, G.; ABASTABAR, M.; MEIS, J.F.; BABAEIAN, M.; KHODAVAISY, S.; BOEKHOUT, T.; BADALI, H. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. **BMC Infect. Dis**, v. 18, n. 24, 2018.

AUTHOR, C.; SHOKOHI, T.; REZA AGHILI, S.; ALI BOROUMAND, M.; HASHEMI FESHARAKI, S.; SALMANIAN, B. Intravenous Catheter-Associated Candidemia due to *Candida membranaefaciens*: The First Iranian Case. **J. Tehran Univ. Heart Center**, v. 10, n. 1, pp. 101–105, 2015.

BADDLEY, J.W.; BENJAMIN, D.K.; PATEL, M.; MIRÓ, J.; ATHAN, E.; BARSIC, B.; BOUZA, E.; CLARA, L.; ELLIOTT, T.; KANAFANI, Z.; et al. *Candida* infective endocarditis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**, v. 27, n. 1, pp. 519–529, 2008.

BADIEE, P. Evaluation of human body fluids for the diagnosis of fungal infections. **Biomed. Res. Int**, 2013.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. DST - **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, pp. 22-38, 2010.

BARBIERI, D.S.V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na Superfície Dentária**. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, pp. 113-123, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BARTON, M.; SHEN, A.; O'BRIEN, K.; ROBINSON, J.L.; DAVIES, H.D.; SIMPSON, K.; ASZTALOS, E.; LANGLEY, J.; LE SAUX, N.; SAUVE, R.; et al. Early-onset invasive candidiasis in extremely low birth weight infants: Perinatal acquisition predicts poor outcome. **Clin. Infect. Dis**, v. 64, n. 1, pp. 921–927, 2017.

BASKARAN, R.; LEE, J; YANG, S.G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. **Biomater. Res.**, v. 22, n. 1, pp. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.

BASMACIYAN, L.; BON, F.; PARADIS, T.; LAPAQUETTE, P.; DALLE, F. *Candida Albicans* Interactions with The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier. **Tissue Barriers**, v. 7, n.1, 2019.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M.P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F.B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect. Dis**, v. 6, n. 21, 2006.

BAUMGARDNER, D.J. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. **J. Patient-Cent. Res. Rev**, v. 6, n.1, pp. 252–261, 2019.

BEARDSLEY, J.; HALLIDAY, C.L.; CHEN, S.C.A.; SORRELL, T.C. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: Perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiol**, v. 13, n.1, pp. 1175–1191, 2018.

BENNETT, R.J. The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 28, n. 1, pp. 10–17, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.06.017>.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B.C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v.9, n. 1, p.312, 2020.

BOLOGNIA, J.; SCHAFFER, J.; CERRONI, L. **Dermatology**, 4th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, v. 2, 2018. ISBN 978-0-7020-6275-9.

BONDARYK, M.; KURZATKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: Mode of action and resistance development. **Postepy Dermatol. Alergol**, v. 30, n. 1, pp. 293–301, 2013. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.38358>.

BOSE, B.; DUBE, A. Photodynamic efficacy of chlorin p6: a pH dependent study in aqueous and lipid environment. **J Photochem Photobiol B**, v. 93, n. 1, pp. 32-5. 2008.

BOW, E.J.; EVANS, G.; FULLER, J.; LAVERDIÈRE, M.; ROTSTEIN, C.; RENNIE, R.; SHAFRAN, S.D.; SHEPPARD, D.; CARLE, S.; PHILLIPS, P.; et al. Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol**, v. 21, n. 1, 2010.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n. 1, pp. 86-107, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.

CALANDRA, T.; ROBERTS, J.A.; ANTONELLI, M.; BASSETTI, M.; VINCENT, J.L. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: An updated approach to an old enemy. **Crit. Care**, v. 20, n. 125, 2016.

CALVETE, M.J.F.; GOMES, A.T.P.; MOURA, N.M. Clorinas em Terapia Fotodinâmica – Síntese e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, pp. 92-103, 2009. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090012>.

CARDOSO, B.C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de Candida albicans e Candida dubliniensis.** 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho, 2004.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol**, v. 122, n. 1, pp. 785–794, 2015.

CASTELO BRANCO, S.; FERREIRA, A.T.; SARAIVA, S.; SILVA, M.J.; GARCIA, T. Fungal Gastroduodenitis. **Eur. J. Case Rep. Intern. Med**, v. 2, 2017.

CDC - **Centers for Disease Control and Prevention Candida Infections of the Mouth, Throat, and Esophagus.** Available online: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/thrush/index.html> (accessed on 18 september 2022). Page last reviewed: February 25, 2021.

CELLI, J.P.; SPRING, B.Q.; RIZVI, I.; EVANS, C.L.; SAMKOE, K.S.; VERMA, S.; POGUE, B.W.; HASAN, T. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization. **Chem Rev**, v. 110, n. 5, pp. 2795–2838, 2010. <https://doi.org/10.1021/cr900300p>.

CHAN, Y. LAI, C. Bactericidal effects of different laser wavelengths on peridontopathic germs in photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 1, pp. 51-55, 2003. <https://doi.org/10.1007/s10103-002-0243-5>.

CHAVANTES, M.C. **Laser em Biomedicina – Princípios e Prática.** São Paulo: Editora Atheneu, pp.60-102, 2009.

CHEN, H.; HUMBLE, S.W.; JINADASA, R.G.W.; ZHOU, Z.; NGUYEN, A.L.; VICENTE, M.G.H.; SMITH, K.M. Syntheses and PDT activity of new mono- and di-conjugated derivatives of chlorin e6. **J Porphyr Phthalocyanines**, v. 21, n. 4-6, pp. 354–363, 2017. <https://doi.org/10.1142/S1088424617500262>.

CHEVALIER, M.; RANQUE, S.; PRÊCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: A review. **Med. Mycol**, v. 56, n. 1, pp. 653–667, 2018.

CHOI, J.S.; LEE, J.W.; SHIN, U.C.; LEE, M.W.; KIM, D.J.; KIM, S.W. Inhibitory activity of silver nanoparticles synthesized using *lycopersicon esculentum* against biofilm formation in candida species. **Nanomaterials**, v.9, n., 1, p. 1512, 2019.

CHOI, S.Y.; YOON, K.H.; LEE, J.I.; MITCHELL, R.J. Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment". **BioMed Research International**. 2015. Article ID 465056, 8 pages. doi.org/10.1155/2015/465056.

CHOUKRI, F.; BENDERDOUCHE, M.; SEDNAOUI, P. In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida* spp. to topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents. **J. Mycol. Med**, v. 24, n. 1, pp. 303–307, 2014.

CHUDZIK, B.; KOSELSKI, M.; CZURYLO, A.; TREBACZ, K.; GAGOS, M. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **Eur Biophys J**, v. 44, n. 1-2, pp. 77-90, 2015. doi.org/10.1007/s00249-014-1003-8.

CIUREA, C.N.; KOSOVSKI, I.-B.; MARE, A.D.; TOMA, F.; PINTEA-SIMON, I.A.; MAN, A. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 857, 2020.

COBO, F.; RODRÍGUEZ-GRANGER, J.; SAMPEDRO, A.; ALIAGA-MARTÍNEZ, L.; NAVARRO-MARÍ, J.M. *Candida* Prosthetic Joint Infection. A Review of Treatment Methods. **J. Bone Jt. Infect**, v. 2, n. 1, pp. 114–121, 2017.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A.G. *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 154, 2020.

COSTA, A.C.; CAMPOS, V.M.R.; PEREIRA, C.A.; SILVA, E.S.H.; BELTRAME, M.J.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine and LED mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 11, pp. 1299-1305, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.05.013>.

DARMSTADT, G.L.; DINULOS, J.G.; MILLER, Z. Congenital cutaneous candidiasis: Clinical presentation, pathogenesis, and management guidelines. **Pediatrics**, v. 105, n. 1, pp. 438–444, 2000.

DE LEON, E.M.; JACOBBER, S.J.; SOBEL, J.D.; FOXMAN, B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC Infect. Dis**, v. 2, n. 1, 2002.

DICLE, O.; PARMAKSIZOGLU, B.; GURKAN, A.; TUNCER, M.; DEMIRBAS, A.; YILMAZ, E. Skin infections in 401 renal transplant recipients in southern Turkey—PubMed. **Exp. Clin. Transpl**, v. 7, n. 1, pp. 133–136, 2009.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E.J. Candida. In: ANAISSIE, E.J.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. **Clinical Mycology**. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 2009.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev**, Washington, v. 15, n. 2, p.167-193, 2002.

DONNELLY, R.F.; MCCARRON, P.A.; TUNNEY, M.M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, pp. 1-12, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001>.

DORKO, E.; BARANOVÁ, Z.; JENČA, A.; KIZEK, P.; PILIPČINEC, E.; TKÁČIKOVÁ, L. Diabetes mellitus and candidiasis. **Folia Microbiol**, v. 50, n. 1, pp. 255–261, 2005.

DU, X.; XIONG, H.; YANG, Y.; YAN, J.; ZHU, S.; CHEN, F. Dynamic study of oral Candida infection and immune status in HIV infected patients during HAART. **Arch. Oral Biol**, v. 115, n. 1, 2020.

ESCHENAUER, G.A.; KWAK, E.J.; HUMAR, A.; POTOSKI, B.A.; CLARKE, L.G.; SHIELDS, R.K.; ABDEL-MASSIH, R.; SILVEIRA, F.P.; VERGIDIS, P.; CLANCY, C.J.; et al. Targeted Versus Universal Antifungal Prophylaxis Among Liver Transplant Recipients. **Am. J. Transplant**, v. 15, n. 1, pp. 180–189, 2015.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Suspension of Marketing Authorisations for Oral Ketoconazole Benefit of Oral Ketoconazole Does Not Outweigh Risk of Liver Injury in Fungal Infections on 25 July 2013, the European Medicines Agency’s Committee on Medicinal Products for Human Use; **European Medicines Agency**: London, UK, 2013.

FAITH, J.J.; GURUGE, J.L.; CHARBONNEAU, M.; SUBRAMANIAN, S.; SEEDORF, H.; GOODMAN, A.L.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHT, R.; HEATH, A.C.; LEIBEL, R.L.; et al. The long-term stability of the human gut microbiota. **Science**, v. 341, n. 1, 2013.

GAD, M.M.; FOUUDA, S.M. Current perspectives and the future of candida albicans-associated denture stomatitis treatment. **Dent. Med. Probl**, v. 57, n. 1, pp. 95–102, 2020.

GALEZOWSKI, M.; GRYKO, D.T. Recent advances in the synthesis of hydroporphyrins. **Curr. Org. Chem**. v. 11, n. 65, pp. 1310-38, 2007.

GAMALETSOU, M.N.; KONTOYIANNIS, D.P.; SIPSAS, N.V.; MORIYAMA, B.; ALEXANDER, E.; ROILIDES, E.; BRAUSE, B.; WALSH, T.J. Candida osteomyelitis: Analysis of 207 pediatric and adult cases (1970-2011). **Clin. Infect. Dis**, v. 55, n. 1, pp. 1338–1351. 2012.

GANDRA, P.G.; ALVES, A.A.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L.T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química nova**, v. 27, n. 6, pp. 980-985, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600024>.

GAO, Y.H.; LI, M.Y.; SAJJAD, F.; WANG, J.H.; MEHARBAN, F.; GADOORA, M.A.; YA, Y.J.; NYOKONG, T.; CHEN, Z.L. Synthesis and pharmacological evaluation of chlorin derivatives for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. **Eur J Med Chem**, v. 189, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112049>.

GIL-BONA, A.; AMADOR-GARCÍA, A.; GIL, C.; MONTEOLIVA, L. The external face of Candida albicans: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. **J. Proteom**, v. 180, n. 1, pp. 70–79, 2018.

GONZALEZ-LARA, M.F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive Candidiasis. **Semin. Respir. Crit. Care Med**, v. 41, n. 1, pp. 3–12, 2020.

GOW, N.A.R. et al. Candida albicans morphogenesis and host defense: discriminating invasion from colonization. **Nat. Rev. Microbiol**, Londres, v. 10, n.2, p. 112-122, 2012.

GREENBERG, R.G.; BENJAMIN, D.K. Neonatal candidiasis: Diagnosis, prevention, and treatment. **J. Infect.**, v. 69, n. 1, pp. 19–22, 2014.

GUPTA, A. Systemic antifungal agents. In **Comprehensive Dermatologic Drug Therapy**; Wolverton, S., Ed.; Saunder: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp. 101–112.

HAJIN, K.I.; SALIH, D.S.; RASSAN, Y.Z. Laser light combined with a photosensitizer may eliminate methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. **Laser Med Sci**, v. 25, n. 1, pp.743–748, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10103-010-0803-z>.

HASSAN, A.; MANSOUR, K.; MAHMOUD, H. Biosynthesis of silver nanoparticles (Ag-Nps) (a model of metals) by Candida albicans and its antifungal activity on Some fungal pathogens (Trichophyton mentagrophytes and Candida albicans). **N. Y. Sci. J**, v. 6, n. 1, pp. 27–34, 2013.

HELLSTEIN, J.W.; MAREK, C.L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head Neck Pathol**, v. 13, n. 1, pp. 25–32, 2019.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: Virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol*, v. 54, n. 1, pp. 149–169, 2016.

HOVERSTEN, P.; KAMBOJ, A.K.; KATZKA, D.A. Infections of the esophagus: An update on risk factors, diagnosis, and management. **Dis. Esophagus**, v. 31, n. 1, 2018.

HOVERSTEN, P.; OTAKI, F.; KATZKA, D.A. Course of Esophageal Candidiasis and Outcomes of Patients at a Single Center. **Clin. Gastroenterol. Hepatol**, v. 17, n. 1, pp.200–202, 2019.

HSU, J.F.; LAI, M.Y.; LEE, C.W.; CHU, S.M.; WU, I.H.; HUANG, H.R.; LEE, I.T.; CHIANG, M.C.; FU, R.H.; TSAI, M.H. Comparison of the incidence, clinical features and outcomes of invasive candidiasis in children and neonates. **BMC Infect. Dis**, v. 18, n. 1, p. 194, 2018.

JABRA-RIZK, M.A.; KONG, E.F.; TSUI, C.; NGUYEN, M.H.; CLANCY, C.J.; FIDEL, P.L.; NOVERR, M. *Candida albicans* pathogenesis: Fitting within the host-microbe damage response framework. **Infect. Immun**, v. 84, n. 1, pp. 2724–2739, 2016.

JEZIOREK, M.; FREJ-MĄDRZAK, M.; CHOROSZY-KRÓL, I. The influence of diet on gastrointestinal *Candida* spp. colonization and the susceptibility of *Candida* spp. to antifungal drugs. **Rocz. Panstw. Zakl. Hig**, v. 70, n. 1, pp. 195–200, 2019.

JOHNSON, M.D.; PERFECT, J.R. Use of antifungal combination therapy: Agents, order, and timing. **Curr. Fungal Infect. Rep**, v. 4, n. 1, pp. 87–95, 2010.

JUNQUEIRA, J.C.; RIBEIRO, M.A.; ROSSONI, R.D.; BARBOSA, J.O.; QUERIDO, S.M.R.; JORGE, A.O.C. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Photodynamic Antimicrobial Effects of Malachite Green on *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* and *Candida*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, pp. 67-72, 2010. <https://doi.org/10.1089/pho.2009.2526>.

KASHEF, N.; ABADI, G.R.S.; DJAVID, G.E. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 9, n. 1, pp. 11-5, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.11.004>.

KASHEM, S.W.; KAPLAN, D.H. Skin Immunity to *Candida albicans*. **Trends Immunol**, v. 37, n. 1, pp. 440–450, 2016.

KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D.; GALLIS, H.A.; MCKINSEY, D.S.; KARCHMER, A.W.; SUGAR, A.M.; SHARKEY, P.K.; WISE, G.J.; MANGI, R.; et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis**, v. 30, n. 1, pp. 14–18, 2000.

KHAN, M.S.A. et al. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. Combating Fungal Infections. In: AHMAD, I., et al. **Combating Fungal Infection: problems and remedy**. Berlin: Springer, pp. 21 – 45, 2010.

KIRKPATRICK, C.H.; HILL, H.R. Chronic mucocutaneous candidiasis. **Pediatr. Infect. Dis. J**, v. 20, n. 1, pp. 197–206, 2001.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Bioch. Pol**, Warsaw, v. 56, n. 2, pp. 211-224, 2009.

KUMAMOTO, C.A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 14, n. 1, pp. 386–391, 2011.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYSTUPSKI, D.; SACZKO, J.; KĘDZIERSKA, E.; KNAP-CZOP, K.; KOTLIŃSKA, J.; MICHEL, O.; KOTOWSKI, K.; KULBACKA, J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed. Pharmacother.**, v. 106, pp. 1098–1107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.

LACAZ, C.S; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Savier, pp. 616-651, 1991.

LEGGIT, J.C. Acute and Chronic Paronychia. **Am. Fam. Physician**, v. 96, n. 1, pp. 44–51, 2017.

LEVINSON, W.E. **Microbiologia e imunologia médicas** [recurso eletrônico] / Warren Levinson; tradução: Danielle Soares de Oliveira Daian; tradução e revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 13. ed. – Porto Alegre: AMGH, 2016.

LEWIS, M.A.O.; WILLIAMS, D.W. Diagnosis and management of oral candidosis. **Br. Dent. J**, v. 223, n. 1, pp. 675–681, 2017. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>

LOGAN, C.; MARTIN-LOECHES, I.; BICANIC, T. Invasive candidiasis in critical care: Challenges and future directions. **Intensive Care Med**, v. 46, n. 1, pp. 2001–2014, 2020.

- MAGDALENA, M.H.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez**, Caracas, v. 39, n. 2, 2001.
- MALUCHE, M.E.; SANTOS, J.I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Rev. Bras. Anal. Clin**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, pp. 65-67, 2008.
- MAMTANI, S.S.; ALJANABI, N.M.; GUPTA RAUNIYAR, R.P.; ACHARYA, A.; MALIK, B.H. *Candida* Endocarditis: A Review of the Pathogenesis, Morphology, Risk Factors, and Management of an Emerging and Serious Condition. **Cureus**, v. 12, n. 1, 2020.
- MARTINS, C.A.P. et al. Presença de *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. **Ciênc. Odontol. Bras**, São José dos Campos, v. 5, n.3, pp. 75-85, 2002.
- MAVER-BISCANIN, M.; MRAVAK-STIPETIC, M.; JEROLIMOV, V. Effect of low-level laser therapy on *Candida albicans* growth in patients with denture stomatitis. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 3, pp. 328-32, 2005. <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.328>.
- METIN, A.; DILEK, N.; BILGILI, S.G. Recurrent candidal intertrigo: Challenges and solutions. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol**, v. 11, n. 1, pp. 175–185, 2018.
- MILLSOP, J.W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clin. Dermatol**, v. 34, n. 1, pp. 487–494, 2016.
- MILNER, J.D.; BRENCHLEY, J.M.; LAURENCE, A.; FREEMAN, A.F.; HILL, B.J.; ELIAS, K.M.; KANNO, Y.; SPALDING, C.; ELLOUMI, H.Z.; PAULSON, M.L.; et al. Impaired TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. **Nature**, v. 452, n. 1, pp. 773–776, 2008.
- MIMA, E.G.; VERGANI, C.E.; MACGADO, A.L.; MASSUCATO, E.M.; COLOMBO, A.L.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 10, pp. 380-388, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03933.x>.
- MISHRA, A.A.; KOH, A.Y. Adaptation of *Candida albicans* During Gastrointestinal Tract Colonization. **Curr. Clin. Microbiol. Rep**, v. 5, n. 1, pp. 165–172, 2018.

MIYABE, M.; JUNQUEIRA, J.C.; COSTA, A.C.B.P.; JORGE, A.O.C.; RIBEIRO, M.S.; FEIST, I.S. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Braz. oral res. [online]**, v. 25, n. 3, pp. 230-234, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242011005000006>.

MOGENSEN, T.H. Primary Immunodeficiencies with Elevated IgE. **Int. Rev. Immunol**, v. 35, n. 1, pp. 39–56, 2016.

MOHAMED, A.A.; LU, X.L.; MOUNMIN, F.A. Diagnosis and Treatment of Esophageal Candidiasis: Current Updates. **Can. J. Gastroenterol. Hepatol.** 2019.

MORITZ, M.N.O.; GONÇALVES, J.L.S.; LINARES, I.A.P.; PERUSSIA, J.R.; OLIVEIRA, K.T. Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative. Photodiagnosis and **Photodynamic Therapy**, v. 17, n. 1, pp. 39-47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.10.005>.

MOYES, D.L.; RICHARDSON, J.P.; NAGLIK, J.R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. **Virulence**, v. 6, n. 1, pp. 338–346, 2015.

MUSHI, M.F.; NGETA, N.; MIRAMBO, M.M.; MSHANA, S.E. Predictors of esophageal candidiasis among patients attending endoscopy unit in a tertiary hospital, Tanzania: A retrospective cross-sectional study. **Afr. Health Sci**, v. 18, n. 1, pp. 66–71, 2018.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartil proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, Washington, v. 67, n. 3, pp. 400-428, 2003.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 67, n. 1, pp. 400–428, 2003.

NAGLIK, J.R.; KÖNIG, A.; HUBE, B.; GAFFEN, S.L. *Candida albicans* - epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 40, n. 1, pp. 104–112, 2017.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETEA, M.G. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system, **Nat. Rev. Microbiol**, Londres, v.6, n. 1, pp. 67–78, 2008.

NEVILLE, B.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M; BOUQUOT, J.E. **Patologia oral & maxilofacial** / [tradução Danielle Resende Camisasca Barroso et al.]. — Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NG, W.F.; VON DELWIG, A.; CARMICHAEL, A.J.; ARKWRIGHT, P.D.; ABINUN, M.; CANT, A.J.; JOLLES, S.; LILIC, D. Impaired TH17 responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with and without autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. **J. Allergy Clin. Immunol**, v. 126, n. 1, 2010.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 69, n. 1, pp. 71–92, 2015.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100029>.

O'DONNELL, L.E.; MILLHOUSE, E.; SHERRY, L.; KEAN, R.; MALCOLM, J.; NILE, C.J.; RAMAGE, G. Polymicrobial *Candida* biofilms: Friends and foe in the oral cavity. **FEMS Yeast Res**, v. 15, 2015.

OLIVEIRA, K.T.; SOUZA, J.M.; GOBO, N.R.S.; ASSIS, F.F.; BROCKSOM, T.J. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Rev. Virtual Quim**, v. 7, n. 1, pp. 310-335, 2015.

OMBRELLA, A.M.; RAMOS, L.; RAMOS, L. Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. **Rev. Iberoam. Micol**, Barcelona, v. 25, n. 1, pp. 12-16, 2008.

ORMOND, A.B.; FREEMAN, H.S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials (Basel)**, v. 6, n. 3, pp. 817–840, 2013. <https://doi.org/10.3390/ma6030817>.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.R.; CLANCY, C.J.; MARR, K.A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; SCHUSTER, M.G.; VAZQUEZ, J.A.; WALSH, T.J.; et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis**, v. 62, n. 1, pp.1–50, 2015.

PAPPAS, P.G.; LIONAKIS, M.S.; ARENDRUP, M.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nat. Rev. Dis. Prim**, v. 4, n. 1, pp.1–20, 2018.

PATTERSON, T.F.; THOMPSON, G.R.; DENNING, D.W.; FISHMAN, J.A.; HADLEY, S.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, D.P.; MARR, K.A.; MORRISON, V.A.; NGUYEN, M.H.; et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clin. Infect. Dis**, v. 63, n. 1, pp. 1–60, 2016.

PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G.; SOUZA, V.R. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 2, pp. 231-7, 2008. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0040-9>.

PÉREZ-LAGUNA, V.; PÉREZ-ARTIAGA, L.; LAMPAYA-PÉREZ, V.; GARCÍA-LUQUE, I.; BALLESTA, S.; NONELL, S.; PAZ-CRISTOBAL, M.P.; GILABERTE, Y.; REZUSTA, A. Bactericidal Effect of Photodynamic Therapy, Alone or in Combination with Mupirocin or Linezolid, on *Staphylococcus aureus*. **Front Microbiol**, v. 31, n. 8, p.1002, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01002>.

PERUSSI, J.R. Inativação Fotodinâmica de microrganismos. **Química nova**, v. 30, n. 4, pp. 988-994, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>.

PETERS, B.A.; WU, J.; HAYES, R.B.; AHN, J. The oral fungal mycobiome: Characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. **BMC Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 157, 2017.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M. Nosocomial candidiasis: Antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. **Med. Mycol**, v. 54, n. 1, pp. 1–22, 2016.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, pp. 133-63, 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>.

QIN, Y.; ZHANG, L.; XU, Z.; ZHANG, J.; JIANG, Y.Y.; CAO, Y.; YAN, T. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 7, n. 1, pp. 512–526, 2016.

RAFIQ, N.B. Candidiasis. **StatPearls**, pp. 1261–1267, 2020.

RAMOS, R.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; FERNANDES, A.U.; BAPTISTA, M.S. Ação fotodinâmica de derivados da protoporfirina IX sobre *Trichophyton rubrum*. **An Bras Dermatol**, v. 91, n. 2, pp. 135-40, 2016. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20163643>.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. In: *Fármacos Antifúngicos. Farmacologia*. Elsevier, 7ª ed. 2011.

REDMOND, R.W.; GAMLIN J.N. A compilation of Singlete Oxygen Yelds from Biologically Relevant Molecules. **Photochemis and Photobiology**, v. 70, pp. 391-475, 1999.

REYNA-BELTRÁN, E.; ISAAC BAZÁN MÉNDEZ, C.; IRANZO, M.; MORMENEO, S.; PEDRO LUNA-ARIAS, J. The Cell Wall of *Candida albicans*: A Proteomics View. In ***Candida Albicans***; Sandai, D., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2019.

RIBEIRO, C.M.; CAIXETA, C.A.; CARLI, M.L.; SPERANDIO, F.F.; MAGALHÃES, S.E.M.; PEREIRA, A.C.; HANEMANNA, J.A.C. Photodynamic inactivation of oral paracoccidioidomycosis affecting woman with systemic lupus erythematosus: An unusual case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 17, n. 1, pp. 160-163, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.12.006>.

RIBEIRO, E, L. **Leveduras de Candida isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos fenogenotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RIBEIRO, E.L. et al. *Candida albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down: Comportamento de tubos germinativos, exoenzimas e sensibilidade a toxinas “killer”. **Rev. Odonto Ciênc**, Porto Alegre, v. 22, n. 1, p. 57, 2007.

RIBEIRO, M.C. **Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência ao fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas**. 2002. 156 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RICHARDSON, J.P.; HO, J.; NAGLIK, J.R. *Candida*–epithelial interactions. **J. Fungi**, v. 4, n. 1, p. 22, 2018.

RICHARDSON, J.P.; MOYES, D.L. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 6, n. 1, pp. 327–337, 2015.

ROBERTSON, K.D.; NAGRA, N.; MEHTA, D. **Esophageal candidiasis**. [Updated 2022 Aug 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537268/>.

ROBERTSON, K.D.; NAGRA, N.; MEHTA, D. Esophageal Candidiasis. **StatPearls**, v. 1, n. 1, pp. 64–65, 2013.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C.; MARTÍNEZ-HERRERA, E.; CARNERO-GREGORIO, M.; LÓPEZ-BARCENAS, A.; FABBROCINI, G.; FIDA, M.; EL-SAMAHY, M.; GONZÁLEZ-CESPÓN, J.L. Pathogenesis and Clinical Relevance of Candida Biofilms in Vulvovaginal Candidiasis. **Front. Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 2884, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.544480>.

ROSA, L.P.; SILVA, F.C.; NADER, S.A.; MEIRA, G.A.; VIANA, M.S. Antimicrobial photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus biofilms in bone specimens using methylene blue, toluidine blue ortho and malachite green: An in vitro study. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 5, pp. 675-680, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.010>.

ROSOLOWSKI, M.; KIERZKIEWICZ, M. Etiology, diagnosis and treatment of infectious esophagitis. **Prz. Gastroenterol**, v. 8, n. 1, pp. 333–337, 2013.

SALEHI, B.; KREGIEL, D.; MAHADY, G.; SHARIFI-RAD, J.; MARTINS, N.; RODRIGUES, C.F. Management of Streptococcus mutans-Candida spp. Oral Biofilms' Infections: Paving the Way for Effective Clinical Interventions. **J. Clin. Med**, v. 9, n. 1, p. 517, 2020.

SALES, M.B.G. **Efeito da terapia antimicrobiana, utilizando o azul de metileno como agente fotossensibilizante sobre o crescimento de Candida albicans**. 2006. 43f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

SANGHVI, R.; SIDDIK, D.; HULLAH, E.; SHAH, T.; CAREY, B. Chronic mucocutaneous candidiasis: A rare diagnosis in paediatric dentistry. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg**, v. 58, n. 1, pp. 708–710, 2020.

SAV, H.; ALTINBAS, R.; BESTEPE DURSUN, Z. Fungal profile and antifungal susceptibility pattern in patients with oral candidiasis. **Infez. Med**, v. 28, n. 1, pp. 392–396, 2020.

SCHERMA, A. P. et al. Presença de Candida spp na cavidade bucal de lactantes durante os primeiros quatro meses de vida. **Cienc. Odontol. Bras**, São José dos Campos, v. 7, n. 3, pp. 79-86, 2004.

SCHLAGER, E.; ASHACK, K.; KHACHEMOUNE, A. Erosio interdigitalis blastomycetica: A review of interdigital candidiasis. **Dermatol. Online J**, v. 24, 13030, 2018.

SCHNABEL, R.M.; LINSSSEN, C.F.; GUION, N.; VAN MOOK, W.N.; BERGMANS, D.C. Candida pneumonia in intensive care unit? **Open Forum Infect. Dis**, v. 1, 2014.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S.L.; CAETANO, M.; ANTUNES, L.; FINLAY, B.B. Gut microbiota in health and disease. **Physiol. Rev**, v. 90, n. 1, pp. 859–904, 2010.

SERRANO, J.; LÓPEZ-PINTOR, R.M.; RAMÍREZ, L.; FERNÁNDEZ-CASTRO, M.; SANZ, M.; MELCHOR, S.; PEITEADO, D.; HERNÁNDEZ, G. Risk factors related to oral candidiasis in patients with primary Sjögren's syndrome. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 25, n. 1, pp. 700–705, 2020.

SHOHAM, S.; NUCCI, M.; WALSH, T.J. **Mucocutaneous and Deeply Invasive Candidiasis**. In Tropical Infectious Diseases; Guerrant, R.L., Walker, D.H., Weller, P.F., Eds.; Elsevier Inc.: Boston, MA, USA, pp. 589–596, 2011. ISBN 9780702039355.

SHULTS, E.E.; SHAKIROV, M.M.; TOLSTIKOV, G.A.; KALININ, V.N.; SCHMIDHAMMER, G. Thebaine Adducts with Maleimides. Synthesis and Transformations. **Russian Journal of Organic Chemistry**, Vol. 41, No. 8, 2005, pp. 1132–1144.

SIDDHARTHAN, T.; KARAKOUSIS, P.C.; CHECKLEY, W. Empirical antifungal therapy in critically ill patients with sepsis. **JAMA J. Am. Med. Assoc**, v. 316, n. 1, pp. 1549–1550, 2016.

SIMÕES, R.J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, M.H. Infecções por Candida spp na Cavidade Oral. **Odontol. Clín. Cient.** [online], v. 12, n. 1, pp. 19-22, 2013.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, pp. 801–807, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500016>.

SOLTÉSZ, B.; TÓTH, B.; SARKADI, A.K.; ERDOS, M.; MARÓDI, L. The evolving view of IL-17-mediated immunity in defense against mucocutaneous candidiasis in humans. **Int. Rev. Immunol**, v. 34, n. 1, pp. 348–363, 2015.

SONTHALIA, S.; AGRAWAL, M.; SEHGAL, V. Topical ciclopirox olamine 1%: Revisiting a unique antifungal. **Indian Dermatol. Online J**, v. 10, n. 1, p. 481, 2019.

SPINILLO, A.; PIZZOLI, G.; COLONNA, L.; NICOLA, S.; DE SETA, F.; GUASCHINO, S. Epidemiologic characteristics of women with idiopathic recurrent vulvovaginal candidiasis. **Obs. Gynecol**, v. 5, n. 1, pp. 721–727, 1993.

STAMATIADES, G.A.; IOANNOU, P.; PETRIKKOS, G.; TSIOUTIS, C. Fungal infections in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review. **Mycoses**, v. 61, n. 1, pp. 366–376, 2018.

STOCKERT, J.C.; CANETE, M.; JUARRANZ, A.; VILLANUEVA, A.; HOROBIN, R.W.; BORRELL, J.; TEIXIDO, J.; NONELL, S. Porphycenes: Facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. **Curr Med Chem**. v. 14, n. 1, pp. 997–1026, 2007.

SURYANA, K.; SUHARSONO, H.; ANTARA, I.G.P.J. Factors associated with oral candidiasis in people living with HIV/AIDS: A case control study. **HIV/AIDS Res. Palliat. Care**, v. 12, n. 1, pp. 33–39, 2020.

SUZUKI, L.C. **Desenvolvimento de biofilme formado por Candida albicans in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Matérias) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SWAMIAPPAN, M. Anogenital pruritus—An overview. **J. Clin. Diagn. Res**, v. 10, WE01–WE03, 2016.

TALAPKO, J.; MATIJEVIĆ, T.; JUZBAŠIĆ, M.; ANTOLOVIĆ-POŽGAIN, A.; ŠKRLEC, I. Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry, Cardiology and Dermatology. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1400, 2020.

TEGOS, G.P.; MASAGO, K.; AZIZ, F.; HIGGINBOTHAM, A.; STERMITZ, F.R.; HAMBLIN, M.R. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, pp. 3202-3209, 2008. <https://doi.org/10.1128/AAC.00006-08>.

TISSOT, F.; AGRAWAL, S.; PAGANO, L.; PETRIKKOS, G.; GROLL, A.H.; SKIADA, A.; LASS-FLÖRL, C.; CALANDRA, T.; VISCOLI, C.; HERBRECHT, R. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. **Haematologica**, v. 102, n. 1, pp. 433–444, 2017.

TONG, Y.; TANG, J. Candida albicans infection and intestinal immunity. **Microbiol. Res**, v. 198, n. 1, pp. 27–35, 2017.

- TOREZAN, L.; NIWA, A.B.M.; FESTA, N. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 5, pp. 445-459, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000500002>.
- UCHOA, A.F.; IAMAMOTO, Y.; SERRA, O.A.; OLIVEIRA, K.T.; BAPTISTA, M.S.; BORTOLUZZI, A.J. Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 8824-8832, 2011. <https://doi.org/10.1021/jo201568n>.
- URIZAR, J.M.A. Candidíasis orales. **Rev. Iberoam. Micol**, Barcelona, v.19, pp. 17-21, 2002.
- VALLE, G.C.; RENDE, J.C.; OKURA, M.H. Estudo da Incidência do Gênero Candida em Hospital Público Universitário. **NewsLab**, São Paulo, v.17, n.101, pp. 202-222, 2010.
- VAN RIJT, S.H.; SADLER, P.J. Current Applications and Future Potential for Bioinorganic Chemistry in the Development of Anticancer Drugs. **Drug Discovery Today**, v. 14, pp. 1089-1097, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.003>
- VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. Anidulafungin: A novel echinocandin. **Clin. Infect. Dis**, v. 43, n. 1, pp. 215–222, 2006.
- VERMA, S.K.; MAHESHWARI, S.; SINGH, R.K.; CHAUDHARI, P.K. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. **Natl J Maxillofac Surg**, v. 3, n. 2, pp. 124-32, 2012. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.111342>.
- VIDOTTO, V. et al. Adherence of Candida albicans and Candida dubliniensis to bucal and vaginal cells. **Rev. Iberoam. Micol**, Barcelona, v. 20, n. 1, pp. 52-54, 2003.
- VIEIRA, J. D. G. et al. Candida albicans isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por Streptomyces sp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Brasilia, v. 38, n. 5, pp. 383-386, 2005.
- VILELA, S.F.; JUNQUEIRA, J.C.; BARBOSA, J.O.; MAJEWSKI, M.; MUNIN, E.; JORGE, A.O. Photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 6, pp. 704-10, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.12.002>.
- VISSCHER, M.O.; ADAM, R.; BRINK, S.; ODIO, M. Newborn infant skin: Physiology, development, and care. **Clin. Dermatol**, v. 33, n. 1, pp. 271–280, 2015.

- WALKER, G.M.; WHITE, N.A. **Introduction to Fungal Physiology**. In *Fungi: Biology and Applications*; Kavanagh, K., Ed.; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 2017; p. 4. ISBN 978-1-119-37432-9.
- WANG, Y.; MCGUIRE, T.M.; HOLLINGWORTH, S.A.; DONG, Y.; VAN DRIEL, M.L. Antifungal agents for invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill adults: What do the guidelines recommend? **Int. J. Infect. Dis**, v. 89, n. 1, pp. 137–145, 2019.
- WANG, Y.C.; TSAI, I.C.; LIN, C.; HSIEH, W.P.; LAN, C.Y.; CHUANG, Y.J.; CHEN, B. Sen Essential functional modules for pathogenic and defensive mechanisms in candida albicans infections. **Biomed. Res. Int**, 136130, 2014.
- WEITKAMP, J.H.; NANIA, J.J. **Infectious Diseases**. In *Neonatal Neurology*; Fenichel, G.M., Ed.; Elsevier Inc.: Boston, MA, USA, pp. 109–141, 2007. ISBN 9780443067242.
- WIEDERHOLD, N.P. Antifungal resistance: Current trends and future strategies to combat. **Infect. Drug Resist**, v. 10, n. 1, pp. 249–259, 2017.
- XU, J.; SCHWARTZ, K.; BARTOCES, M.; MONSUR, J.; SEVERSON, R.K.; SOBEL, J.D. Effect of antibiotics on vulvovaginal candidiasis: A metronet study. **J. Am. Board Fam. Med**, v. 21, n. 1, pp. 261–268, 2008.
- YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther. Clin. Risk Manag**, v. 10, n. 1, pp. 95–105, 2014.
- ZARDO, V.; MEZZARI, A. Antifúngicos nas infecções por Candida sp. **Newslab**, São Paulo, v. 63, n. 1, pp. 136-146, 2004.
- ZDANAVIČIENĖ, E.; SAKALAUŠKIENĖ, J.; GLEIZNYS, A.; GLEIZNYS, D.; ŽILINSKAS, J. Host responses to Candida albicans. A review. **Stomatologija**, v. 19, n. 1, pp. 109–123, 2017.
- ZHU, W.; FILLER, S.G. Interactions of Candida albicans with epithelial cells. **Cell. Microbiol**, v. 12, n. 1, pp. 273–282, 2010.
- ZOLFAGHARI, P.S.; PACKER, S.; SINGER, M.; NAIR, S.P.; BENNETT, J.; STREET, C.; WILSON, M. In vivo killing of Staphylococcus aureus using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 27, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-27>.