

Estudos in vitro de fotofármacos aplicados na inativação e terapia fotodinâmica

In vitro studies of photopharmaceuticals applied to inactivation and photodynamic therapy

RESUMO

Leiddi Laura Maria Leal

lauraleiddi@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Leandro Herculano da Silva

leandroh@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Marcia Antonia Bartolomeu Agustini

marciaagustini@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

Flávio Dias Ferreira

flavioferreira@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, Paraná, Brasil

A terapia fotodinâmica é uma alternativa promissora no tratamento de doenças e descontaminações envolvendo fungos, vírus e bactérias, portanto, esta pesquisa consistiu em avaliar o desempenho do corante azul de metileno como agente fotossensibilizador na inativação de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, através do método in-vitro de análise. Inicialmente, a cepa de *Escherichia coli* foi ativada e isolada para a obtenção do inóculo original, uma amostra de bactérias na concentração ideal para o uso no experimento laboratorial. Em seguida, foram feitas amostragens para tratamento em duas microplacas, estabelecendo os controles positivo e negativo de crescimento, o controle de fotodegradação do azul de metileno e o processo de diluição do inóculo. Uma microplaca foi incubada para crescimento sob exposição de luz LED e a outra sem a exposição de luz LED, a critério de comparação. Posteriormente as amostras foram plaqueadas e incubadas para a análise dos resultados. Conforme proposto, o método seria aplicado nas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, porém a experimentação foi interrompida devido a paralização das atividades gerada pela pandemia de Covid-19.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento. Bactérias. Azul de metileno.

ABSTRACT

Photodynamic therapy is a promising alternative in the treatment of diseases and decontamination involving fungi, viruses and bacteria, therefore, this research consisted of evaluating the performance of methylene blue dye as a photosensitizing agent in inactivating strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*, through the in-vitro method of analysis. Initially, the strain of *Escherichia coli* was activated and isolated to obtain the original inoculum, a sample of bacteria in the ideal concentration for use in the laboratory experiment. Then, samples were taken for treatment in two microplates, establishing the positive and negative growth controls, the photodegradation control of methylene blue and the inoculum dilution process. One microplate was incubated for growth under LED light exposure and the other without LED light exposure, for comparison. Subsequently, the samples were plated and incubated for analysis of the results. As proposed, the method would be applied to the strains of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*, however the experiment was interrupted due to the paralysis of activities generated by the Covid-19 pandemic.

KEYWORDS: Treatment. Bacteria. Methylene blue.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD), é uma modalidade terapêutica que vem obtendo sucesso na eliminação de agentes infecciosos como fungos, vírus e bactérias, se apresentando de forma mais vantajosa no tratamento de microrganismos, que sobretudo, vem adquirindo resistência a antibióticos e antissépticos. A TFD pode ser utilizada no tratamento de câncer, úlceras e queimaduras infectadas, doenças de pele que envolvem microrganismos, e na odontologia e oftalmologia. Dentro da TFD, existe uma área denominada terapia fotodinâmica antimicrobiana ou inativação fotodinâmica (IFD), e nela, agentes antimicrobianos podem ser aplicados nos processos de remoção de contaminantes ambientais, controle de insetos e na esterilização de alimentos (CIEPLIK; DENG e Colaboradores, 2018), (SILVA, 2017), (THAKURI; JOSHI e Colaboradores, 2011), (PINHEIRO; PEIXOTO e Colaboradores, 2018), (CARNEIRO; CATÃO, 2012), (HABERMEYER; GUILARD, 2018), (ALVES; FAUSTINO e Colaboradores, 2015).

O princípio de funcionamento da TFD se dá pela combinação de três elementos fundamentais: um agente fotossensibilizador/fotofármaco, luz com comprimento de onda apropriado a faixa de absorção pelo fotossensibilizador e o oxigênio contido na molécula. O fotofármaco, também conhecido como fotossensibilizador ou corante, é a molécula responsável por absorver energia da luz e gerar espécies de oxigênio que respondem ao tratamento gerando o oxigênio singleto, responsável pela morte dos microrganismos patogênicos, nocivos à saúde ou ao meio (CIEPLIK; DENG e Colaboradores, 2018), (SILVA, 2017).

Vários agentes fotossensibilizadores têm sido utilizados na TFD, sendo os principais o azul de toluidina, o cristal violeta, a tionina, a protoporfirina e o azul de metileno. O uso destes corantes é também mais vantajoso por possuírem baixo custo quando comparados aos medicamentos utilizados nas medicinas tradicionais. São necessárias algumas características específicas para se considerá-los eficientes, tais como: biocompatibilidade com tecidos ou órgãos vivos, para que não haja toxicidade, nocividade e não provocar rejeição imunológica, apresentar baixa toxicidade no escuro, pois deve reagir apenas quando submetido a luz, possuir elevada taxa de produção de espécies reativas, capacidade de absorver a luz visível e ter rápida eliminação pelo organismo. O azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT) são considerados bons produtores de oxigênio singleto, porém, o AM apresenta maior velocidade de reação e maior atividade na inativação de microrganismos patogênicos, sendo este o fotofármaco escolhido para este estudo (DONELLY; MCCARRON e Colaboradores, 2008), (SPERANDIO; HUANG; HANBLIN, 2013), (OLIVEIRA, 2006).

Ao escolher a fonte de luz mais adequada para a utilização na TFD, deve se levar em consideração o comprimento de onda emitido por ela, com capacidade de penetração no tecido biológico e também a máxima absorção pelo agente fotossensibilizador. Para isso, o comprimento de onda deve estar na região espectral do vermelho e infravermelho, entre 630 e 850 nm, que é a região em que a luz apresenta maior penetração e alcança camadas mais profundas. Esse intervalo é conhecido como janela terapêutica ou janela óptica (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010), (SILVA; SANTOS; RICCI-JUNIOR, 2009), (FUJITA, 2016).

Há três fontes de luz disponíveis para a utilização na TFD, são elas as lâmpadas de luz fluorescente, lasers e LEDs (*Light Emitting Diodes*). As lâmpadas

fluorescentes produzem luz com vários comprimentos de onda, e sua vantagem está no baixo custo. Os lasers produzem luz com ondas de mesma frequência e direção, sendo assim, trabalham com luz em comprimento de onda específico, possibilitando a adequação ao espectro de absorção do agente fotossensibilizador, possuem uma radiação bem homogênea, e apresentam mecanismos que facilitam o direcionamento da luz para os locais onde se deseja tratar. A desvantagem dos lasers está relacionada ao alto custo. Os diodos emissores de luz (LEDs) apresentam emissão mais ampla de bandas de luz, menor tamanho e peso, possibilitam a realização da técnica mais rapidamente pois provém luz monocromática, que se relaciona ao pico de absorção pelo agente fotossensibilizador, além de possuir um custo reduzido em comparação aos lasers, sendo esta a fonte de luz escolhida para o estudo (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010), (SILVA; SANTOS; RICCI-JUNIOR, 2009), (COSTA; CAMPOS e Colaboradores, 2011).

Para que a TFD ocorra, a molécula do fotossensibilizador (FS) que se encontra em seu estado fundamental (S_0) deve absorver um fóton de luz passando para o estado excitado singleto (S_1). No estado S_1 , o FS pode emitir um fóton de energia através do processo reativo de fluorescência e não-reativo de reflexões vibracionais, retornando ao estado S_0 , ou pode passar ao estado excitado tripleto (T_1) sofrendo uma inversão de spin causada pelo cruzamento entre sistemas. No estado T_1 , processos radiativos de fosforescência podem levar ao decaimento para o estado fundamental ou poderá passar por dois mecanismos de reação, do tipo I ou II. No mecanismo tipo I a transferência de elétrons entre o FS no estado S_1 ou T_1 e componentes do sistema geram íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, esta reação resulta em produtos oxidados responsáveis pela geração da cadeia de elementos (O_2^- , H_2O_2 ou OH) que causam as lesões e mortes celulares. No mecanismo de tipo II ocorre a transferência de energia do FS no estado T_1 ao oxigênio molecular no estado fundamental tripleto T_0 , levando a geração de oxigênio singleto 1O_2 , um agente altamente destrutivo, responsável pelas mortes celulares (SILVA, 2007), (FUJITA, 2016).

O oxigênio em seu estado singleto é considerado o agente fotodinâmico deste processo, pois induz principalmente a oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios insaturados presentes nas estruturas celulares, levando a morte celular programada pela TFD (SILVA, 2007), (ALVES; FAUSTINO e colaboradores, 2015).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados para assegurar a segurança no experimento laboratorial foram: luvas, jaleco, álcool antisséptico, bico de Bunsen e capela de segurança biológica. Os meios de cultura de bactérias utilizados foram: Caldo EC, Eosin Metileno (EMB) e Plate Count Agar (PCA). Os equipamentos e aparelhos utilizados foram: balança, autoclave, estufas incubadoras BOD, geladeira, agitador Vortex, espectrofotômetro e fonte de luz (LED). Os materiais utilizados no preparo de soluções e amostragens foram: frascos de Erlenmeyer, bastões de vidro, provetas, espátulas, pipetadoras, pipetas, béqueres, tubos de ensaio, tubos de Durhan, alças de platina, placas de Petri, microplacas e plástico filme. Os itens envolvidos no preparo do inóculo foram: água destilada, cepa de bactérias *Escherichia coli*, solução padrão 0,5 da escala Mc Farland, e o item de tratamento utilizado foi a solução de AM.

O primeiro passo na realização do experimento foi a ativação da cepa de bactérias *Escherichia coli*, para isso, fez-se necessário preparar a água salina e o meio de cultura de bactérias, o Caldo EC, e esteriliza-los no aparelho de autoclave. Em seguida, coletou-se alíquotas de bactérias da cepa nos tubos de ensaio contendo no fundo, um tubo invertido para coleta de gás (tubo de Durham), que foram lavados à estufa incubadora BOD para crescimento por 24 horas. Após identificado o crescimento das bactérias, dado pela ocorrência de turbidez e fermentação (produção de gás retida no tubo de Durham), faz-se o isolamento para tornar possível a captação de colônias.

O isolamento de colônias de *Escherichia coli* se deu da seguinte maneira: primeiramente foi preparado e esterilizado na autoclave o meio de cultura, nesta etapa foi utilizado o EMB. Esta solução em temperatura morna foi transferida para placas de Petri e levadas a geladeira. Aproximadamente 24 horas depois, estas placas foram utilizadas para fazer o esgotamento em estrias de bactérias coletadas dos tubos de ensaio com crescimento, que após o cultivo, foram incubadas por 24 horas a 37°C na BOD. Passado esse período, puderam ser observadas colônias de bactérias isoladas nas placas de Petri, que envoltas com plástico filme, foram levadas à geladeira.

O procedimento seguinte consistiu em fazer o preparo do inóculo, que é uma amostra de bactérias *Escherichia coli* na concentração adequada para o uso na aplicação da TFD. Para o preparo desta amostra, utilizou-se aproximadamente 5 colônias de bactérias isoladas das placas de Petri acrescidas de 9 mL de água salina em um tubo de ensaio, e esta solução foi devidamente homogeneizada no agitador Vortex. Para padronizar a concentração bacteriana do inóculo, foi necessário fazer a calibração no espectrofotômetro com a solução padrão 0,5 da escala Mc Farland, sendo esta uma solução turva composta por sulfato de bário e ácido sulfúrico. Primeiramente fez-se a leitura da primeira referência no espectrofotômetro, contendo água destilada, que serviu como branco para as próximas substâncias, para isso, o aparelho foi configurado em "Standard Method", com curva simples e com comprimento de onda de 625 nm, que é o modo de absorbância.

Assim como no procedimento descrito acima, os próximos passos foram fazer a leitura do padrão de turbidez, e em seguida a leitura do inóculo. Na leitura da concentração do inóculo, o valor deve ficar entre 0,08 e 0,10 para ser aceito dentro do padrão de normalidade e o inóculo estar pronto para uso. Entretanto, se apresentar um resultado inferior, deve ser aumentada a concentração de bactérias acrescentando algumas colônias de *Escherichia coli* na solução e repetir todo o processo, e se apresentar um resultado superior ao padrão, deve ser feita a diluição do inóculo, aumentando o volume de água salina na solução e repetir todo o processo.

O procedimento seguinte foi fazer o tratamento de amostras, é nesta etapa que aplicamos o princípio de funcionamento da TFD. Para isso, utilizando a capela de segurança biológica, a amostragem foi preparada igualmente em 2 microplacas, cada uma contendo: controle negativo, onde o meio de cultura (Caldo EC) não recebeu bactérias nem tratamento com o AM, controle positivo, onde o Caldo EC recebeu bactérias e não recebeu tratamento com o AM, com o intuito de demonstrar que as bactérias se desenvolvem naquele meio e condições, o controle de fotodegradação do AM, onde o Caldo EC recebeu apenas o AM, que por sua vez é utilizado para observar a estabilidade do AM em dadas condições, e o processo

de diluição seriada, onde 5 µL do inóculo e 100 µL do AM foram diluídos 8 vezes no meio de cultura e em três repetições, para assegurar uma melhor precisão nos resultados.

Quando feito, as microplacas foram envoltas com plástico filme e colocadas em BOD's separadas, uma ficou exposta a iluminação pela fonte de luz LED e a outra não, ambas a 45°C por aproximadamente 3 horas, quando os poços apresentaram turbidez indicando o crescimento das bactérias. Passado esse período, as microplacas foram retiradas para fazer o processo de plaqueamento, utilizado para verificar se o tratamento foi eficaz.

Nesta etapa, foi feita a escolha de três amostras de diluição seriada do inóculo na microplaca para plaquear, não utilizando poços com concentração muito alta de AM para que a pigmentação não dificultasse a contagem de bactérias. Sendo assim, cada uma das três repetições teve três poços de mesma diluição inocular plaqueados, e para cada poço, foram preparadas três placas, resultando num total de 9 poços com 27 placas de Petri. Desta forma, para o plaqueamento de um poço de diluição inocular, o volume foi dividido em três, um com 50 µL de solução, e os outros dois com 25 µL de solução cada. Estes volumes foram colocados nas placas de Petri acrescidos com o meio de cultura PCA e homogeneizados. As placas de Petri foram levadas à incubação por 24 horas a 37°C para posteriormente fazer a contagem de colônias de bactérias e analisar os resultados.

Passado o período de incubação, verificou-se que não seria possível fazer a contagem de colônias de bactérias *Escherichia coli* nas placas de Petri porque haviam colônias em excesso causando saturação, e conseqüentemente, impedindo o crescimento e desenvolvimento da melhor maneira possível. Sendo assim, foi definido um teste de inóculo, que consistiu num método de diluição seriada para garantir que a quantidade de colônias obtidas nas placas de Petri ficasse dentro de uma faixa desejada.

O teste se deu da seguinte maneira: separou-se um tubo de ensaio para o preparo da solução original, e mais 6 tubos de ensaio para as diluições da solução original em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . No tubo original colocou-se 200 µL de caldo EC, 200 µL de solução de AM, 1mL de inóculo e agitou-se no Vortex. Em cada um dos seis tubos de diluição, colocou-se 9 mL de água salina. Em seguida, foram coletados 500 µL da solução contida no tubo original e passados para o tubo de diluição em 10^{-1} , este foi homogeneizado e dele coletados 500 µL de solução e passados para tubo de diluição em 10^{-2} . O procedimento se repetiu até que todos os tubos de diluição receberam a solução, restando 500 µL na pipeta que foi descartada. Os seis tubos ficaram encubados por aproximadamente 3 horas a 37°C para o crescimento das bactérias, que pôde ser visualizado quando a solução turvou.

Para o plaqueamento, foram preparadas duas placas de Petri para cada tubo de diluição do inóculo, para que o processo fosse feito em duplicata, logo, cada uma recebeu 500 µL da solução acrescida do PCA e homogeneizadas. As placas foram levadas a incubadora por 24 horas a 37°C para posterior análise de resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No teste de inóculo, foi observado que nas placas referentes as diluições em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-6} não houve crescimento bacteriano, e nas placas referentes as diluições 10^{-4} e 10^{-5} houve crescimento bacteriano, então as placas referentes a diluição em 10^{-4} foram escolhidas para fazer a contagem, visto que estas apresentaram uma boa quantidade de colônias isoladas. O cálculo dos resultados foi dado de acordo com a equação $UFC/mL = c/d.v$. UFC é a unidade formadora de colônia, c é o número de colônias contadas na placa (no caso de duplicata foi necessário fazer a média aritmética das placas), d é o fator de diluição da placa contada e v é o volume dessa diluição. Sendo assim, para a nossa análise tivemos $c = 16$, $d = 10^{-4}$ e $v = 0,5$ mL, resultando em $UFC = 320.000$ ou $3,2 \times 10^5$ UFC/mL (SILVA; JUNQUEIRA e Colaboradores, 2017).

Com isto, foi possível verificar que este método de diluição inocular poderia ser implementado no experimento nas fases de tratamento e plaqueamento, resolvendo o problema de saturação de bactérias e tornando possível a contagem de colônias e análise de resultados para verificar a eficiência do AM como agente fotossensibilizador na TFD. Contudo, a metodologia aperfeiçoada foi interrompida em processo de execução devido a paralização das atividades estabelecida em decorrência da pandemia de Covid-19.

CONCLUSÃO

O objetivo desta pesquisa científica foi apresentar o funcionamento da TFD como um mecanismo de combate a ação de microrganismos patogênicos, causadores de doenças e problemas ambientais, testando o fotofármaco azul de metileno na inativação de cepas de bactérias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*. A atividade também teve o intuito de verificar se o método apresentava resultados satisfatórios, que pudessem contribuir no desempenho de outros estudos ou que estimulasse a sua aplicabilidade em políticas públicas.

Inicialmente o método foi aplicado apenas na cepa de *Escherichia coli*, que através da revisão de estudos já concretizados, foi determinada a metodologia do procedimento in-vitro. Primeiramente a cepa foi ativada e isolada para que pudesse haver o preparo do inóculo original, usado no experimento laboratorial. O próximo passo foi fazer o tratamento de amostras em duas microplacas, estabelecendo os controles positivo e negativo de crescimento, o controle de fotodegradação do AM, além do processo de diluição seriada do inóculo somado ao AM. Uma microplaca foi incubada para crescimento sob exposição de luz LED, um dos princípios de funcionamento da TFD, e a outra foi incubada para crescimento sem a exposição de luz, a critério de avaliação do método.

Em sequência foi feito o plaqueamento de amostras das microplacas para fazer a análise dos resultados e verificar a eficiência do AM na inativação dos microrganismos, porém, constatou-se que haviam colônias em excesso naquelas concentrações, causando saturação e impedindo a contagem. Sendo assim, foi definido um teste de inóculo, que através de um método de diluição seriada, garantiu que a quantidade de colônias obtidas nas placas de Petri ficasse dentro de um valor desejado e pudesse ser aplicado nas fases de tratamento e plaqueamento do experimento, garantindo a obtenção e interpretação dos

resultados. Visto que as atividades foram paralisadas em decorrência da pandemia de Covid-19, o aperfeiçoamento do método sob a cepa de *Escherichia coli* foi interrompido, assim como a aplicação da TFD nas demais cepas de bactérias.

AGRADECIMENTOS

Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela disponibilização de estrutura e materiais e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo nº 401160/2016-5).

REFERÊNCIAS

ALVES, E.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; CUNHA, A.; NADAIS, H.; ALMEIDA, A. Reviews Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, C: Photochemistry Reviews, 22:34–57, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389556714000392>. Acesso em: 27 jul. 2020.

CARNEIRO, S.M.; CATÃO, M. H. C. V. Aplicações da Terapia Fotodinâmica na odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, 22(1):25–32, 2012. Disponível em: <https://www.metodista.br/revistas/revistas-unimep/index.php/Fol/article/view/248/946>. Acesso em: 01 jun. 2020.

CIEPLIK, F.; DENG, D.; CRIELAARD, W.; BUCHALLA, W.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A.; MAISCH, T. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, 44(5):571–589, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2018.1467876>. Acesso em: 12 jun. 2020.

COSTA, C. B. P.; CAMPOS, A. R. V. M.; PEREIRA, C. A.; HASHIMOTO, E. S. S. H.; JUNIOR, M. B.; JUNQUEIRA, C.; JORGE, A. O. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, 56(11):1299–1305, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/22717>. Acesso em: 13 mai. 2020.

DONELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiology Research**, 163, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501307000912?via%3Dihub>. Acesso em: 25 mai. 2020.

FUJITA, A. K. L. **Avaliação do efeito fotodinâmico a partir da associação dos precursores da PPIX (ALA e MAL) em epitélio suíno**. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18158/tde-03102016-160420/publico/AlessandraKeikoLimaFujita_6191714_Corrigida.pdf. Acesso em: 28 jun. 2020.

HABERMEYER, B.; GUILARD, R. Applications of porphyrinoids in PDT, PIT and PDI. **Photochemical Photobiological Sciences**, pages 1675–1690, 2018.

Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/pp/c8pp00222c#!divAbstract>. Acesso em: 12 jun. 2020.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: Revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 85(4):501–511, 2010.

OLIVEIRA, C. S. **Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristais violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura**. Page 124, 2006. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-12062008-135805/publico/TeseCarlaSOliveiraParte1.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2020.

PINHEIRO, R. C. Q.; PEIXOTO, M. S.; RIBEIRO, I. L. A.; GOMES, D. Q. C.; PEREIRA, M. S. V.; MOURA, N. C. Efeito fotossensibilizador in vitro da violeta de genciana na terapia fotodinâmica sobre *Candida albicans*. **Revista Família, Ciclos de Vida e Saúde no Contexto Social**, 6(2):158, 2018. Disponível em: [DOI: 10.18554/refacs.v6i2.2810](https://doi.org/10.18554/refacs.v6i2.2810). Acesso em: 27 jun. 2020.

SILVA, E. R.; SANTOS, E. P.; RICCI-JUNIOR, E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Rev. Bras. Farm**, 90(3):211–217, 2009. Disponível em: https://www.rbfarma.org.br/files/pag_211a217_terapia_fotodinamica_228.pdf. Acesso em: 10 jul. 2020.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R. OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Blucher, 5edition, 2017.

SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicações em terapia fotodinâmica**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, 2007.

SPERANDIO, F.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, 8(2):108–120, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3740068/>. Acesso em: 23 jul. 2020.

THAKURI, P. S.; JOSHI, R.; BASNET, S.; PANDEY, S.; TAUJALE S. D.; MISHRA, N. Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro. **Nepal Medical College Journal**, 13(4):281–284, 2011. Disponível em:

<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1052.3794&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 20 jul. 2020.