

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**  
**Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**  
**Aplicadas à Farmácia**



**EFEITO FOTODINÂMICO DA CURCUMINA**  
**EM MICELAS DE CETRIMIDA SOBRE CEPAS**  
**DE CANDIDA SUSCEPTÍVEIS E**  
**RESISTENTES A FLUCONAZOL”**

**Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar Coletti**

Araraquara-SP

2013

**Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar Coletti**

**“EFEITO FOTODINÂMICO DA CURCUMINA EM MICELAS DE  
CETRIMIDA SOBRE CEPAS DE CANDIDA SUSCEPTÍVEIS E  
RESISTENTES A FLUCONAZOL”**

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” Câmpus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Iguatemy Lourenço Brunetti

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Pavarina

Araraquara – SP

2013

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

C694e Coletti, Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar  
Efeito fotodinâmico da curcumina em micelas de cetrimida sobre cepas de *Candida* susceptíveis e resistentes a fluconazol / Tatiana Maria Starck Fogaça de Aguiar Coletti. – Araraquara, 2013  
102 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

Coorientador: Ana Cláudia Pavarina

1. Terapia fotodinâmica. 2. Curcumina. 3. Surfactante. 4. Cândida. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Pavarina, Ana Cláudia, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

**“EFEITO FOTODINÂMICO DA CURCUMINA EM MICELAS DE  
CETRIMIDA SOBRE CEPAS DE CANDIDA SUSCEPTÍVEIS E  
RESISTENTES A FLUCONAZOL”**

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti  
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Livia Nordi Dovigo  
Membro Titular

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Kurachi  
Membro Titular

---

Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima  
Membro Suplente

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosemeire Cristina Linharis Rodrigues Pietro  
Membro Suplente

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Julio Mesquita Filho” Câmpus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Trabalho desenvolvido em colaboração com o laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia – UNESP/Câmpus Araraquara.

Fomento: Bolsa Capes – Mestrado.

# *Agradecimientos*

A **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, **Paulo** e **Maria Auxiliadora**, meus grandes amores, pela compreensão, amor incondicional e exemplo de coragem e perseverança.

Ao meu eterno amor, amigo e marido **André**, por me incentivar a nunca desistir e sempre acreditar em mim.

Meus irmãos **Paulo** e **Thiago** e minha irmã **Alda** por todo amor.

Ao meu cunhado **Leonardo** e minhas cunhadas **Cibele** e **Michelle** pelo carinho.

Minha avó **Cida**, que eu amo tanto.

Aos meus sogros, **Teresa** e **Laerte**, por todo apoio e dedicação em me ajudar no que eu precisasse.

Ao **Profº Drº Iguatemy Lourenço Brunetti**, oportunidade, orientação e pelo conhecimento indispensável para a execução deste trabalho. Obrigada por sempre ter acreditado nele e não ter medido esforços para que ele se tornasse possível.

À **Profª Drª Ana Cláudia Pavarina**, pela oportunidade, orientação, amizade e carinho. Muito obrigada.

À **Profª Drª Lívia Nordi Dovigo** pela sua generosidade, pelos seus ensinamentos e grande carinho. Obrigada pela sua disponibilidade e orientação. Grande profissional e um exemplo de dedicação. Tenho certeza que você é uma grande pessoa, com um coração enorme!

À **Profª. Drª. Tais Maria Bauab** por toda a ajuda, na qual foi de grande importância para a conclusão desse trabalho.

Agradeço às minhas amiga(o)s do Laboratório **Juliana, Cristiane, Paula, Érica, Raissa, Vânia, Renata, Carlos e Vivian** que muito me ajudaram.

A **CAPES** pela bolsa de estudos que tornou o sonho possível.

A todos que sempre me escutaram com tanta paciência!

*“Feliz de quem atravessa  
a vida inteira tendo mil  
razões para viver”*

*Dom Hélder Câmara*

## Resumo

Nos últimos anos o aumento na incidência da candidose superficial ou invasiva causada por espécies emergentes e resistentes aos medicamentos tem sido atribuído a disseminação do uso de antibióticos e/ou agentes imunossupressores. A candidose é considerada uma doença oportunista de alta incidência em pacientes que utilizam medicamentos imunossupressores após transplante de órgãos, antibióticos de amplo espectro, terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida. A Terapia Fotodinâmica (*Photodynamic Therapy* ou PDT) utiliza a combinação de luz (visível) e um composto fotossensível. A maior aplicação da PDT ocorre no tratamento de câncer, entretanto, a técnica está difundindo-se para o tratamento de outras doenças como infecções microbianas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da PDT mediada pela Curcumina, na ausência e na presença do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), com uma fonte de luz do tipo LED, sobre suspensões planctônicas de isolados clínicos das espécies *C. albicans* e *C. glabrata fluconazol-resistentes*, bem como de cepas ATCC. Após a PDT, foram obtidas diluições seriadas de cada amostra e alíquotas foram plaqueadas para a contagem das células viáveis (ufc/mL). O metabolismo celular para todas as condições experimentais também foi avaliado por meio do ensaio de redução do 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]2H-tetrazolium-carboxanilida (XTT). Também foi avaliada a capacidade de adesão/formação de biofilme dessas cepas após a PDT. Para isso, amostras obtidas da fase de adesão e da fase madura dos biofilmes foram monitoradas pela contagem de células viáveis (ufc/mL). Os resultados permitem observar que a utilização da PDT com curcumina em micelas de CTAB em suspensões planctônicas foi capaz de diminuir o metabolismo (XTT) das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* susceptíveis e resistentes ao fluconazol; entretanto, a redução da contagem de células viáveis (ufc/mL) foi mais expressiva nas cepas resistentes ao fluconazol. Em relação à diminuição da capacidade de adesão/formação de biofilme, as cepas resistentes apresentaram valores de log(ufc/mL) inferiores àqueles observados com as cepas ATCC.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica, curcumina, surfactante, *Candida*.

## Abstract

In recent years the increase in the incidence of superficial or invasive candidiasis caused by species emerging drug-resistant and has been attributed to widespread use of antibiotics and/or immunosuppressive agents. Candidiasis is considered an opportunistic disease of high incidence in patients taking immunosuppressive drugs after organ transplantation, broad-spectrum antibiotics, anticancer therapies and who has immunosuppression related to acquired immunodeficiency syndrome. Photodynamic Therapy (PDT) uses a combination of (visible) light and a photosensitive compound. The largest application of PDT occurs in the treatment of cancer, however, the technique is diffusing in the treatment of other diseases such microbial infections. The aim of this study was to evaluate the effect of PDT mediated by Curcumin, in the absence and presence of surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) with a light source type LED on planktonic suspensions of clinical isolates of the species *C. albicans* and *C. glabrata* Fluconazole-resistant strains as well as strains ATCC. After PDT, serial dilutions were collected and aliquots of each sample were plated for viable cell count (cfu/ml). Cellular metabolism for all experimental conditions was also assessed by reduction assay of 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium carboxanilide (XTT). It was also evaluated the ability of adhesion/biofilm formation of these strains after PDT. For this, samples of the accession and the mature phase biofilms were monitored by viable cell count (cfu/mL). The results allow to observe that the use of PDT with curcumin in CTAB micelles in planktonic suspensions was able to decrease metabolism (XTT) strains of *C. albicans* and *C. glabrata* susceptible and resistant to fluconazole, however, the reduction in viable cell count (cfu/mL) was more pronounced in strains resistant to fluconazole. Regarding the decreased ability of adhesion/biofilm formation, resistant strains showed values of log (cfu/mL) lower than those observed with the ATCC strains.

**Keywords:** Photodynamic Therapy, curcumin, surfactant, *Candida*.

## Lista de figuras

	<b>Pag</b>
<b>Figura 1.</b> Etapas de formação de biofilme	<b>24</b>
<b>Figura 2</b> Diagrama de Jablonski	<b>26</b>
<b>Figura 3.</b> Reações do oxigênio singlete com biomoléculas.	<b>27</b>
<b>Figura 4.</b> Variação temporal da absorção da curcumina 40 $\mu$ M em solução salina de NaCl 0,85%, DMSO 10% e CTAB 0,1mM.	<b>46</b>
<b>Figura 5.</b> Variação temporal da absorbância de curcumina 40 $\mu$ M em solução salina NaCl 0,85% e DMSO 10%.	<b>47</b>
<b>Figura 6.</b> Integrais normalizadas dos espectros de absorbância de curcumina 40 $\mu$ M em CTAB 0,1mM, solução salina NaCl 0,85% e DMSO 10% para os tempos de 0 a 30 min.	<b>47</b>
<b>Figura 7.</b> Integrais normalizadas dos espectros de absorbância de curcumina 40 $\mu$ M em solução salina NaCl 0,85% e DMSO 10%, para os tempos de 0 a 30 min.	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Diagramas de caixas contendo os valores para log(ufc/mL) e da absorbância do ensaio do XTT para cepas de <i>C. albicans</i> após aplicação da PDT com curcumina 40 $\mu$ M, em micelas de CTAB: A, <i>C. albicans</i> ATCC; B, <i>C. albicans</i> 15R; C, <i>C. albicans</i> 10R.	<b>50</b>
<b>Figura 9.</b> Imagens da cultura de <i>C. albicans</i> 10R após as condições experimentais: A, FS+L+ curcumina 40 $\mu$ M, em micelas de CTAB 0,1mM; B, FS+L- curcumina 40 $\mu$ M, em micelas de CTAB; C, FS-L-.	<b>51</b>
<b>Figura 10.</b> Diagramas de caixas contendo os valores para log(ufc/mL) e da absorbância do ensaio de XTT para cepas de <i>C. albicans</i> após aplicação da PDT com curcumina 40 $\mu$ M em solução salina 0,85% e DMSO 10%: A, <i>C. albicans</i> ATCC; B, <i>C. albicans</i> 15R; C, <i>C. albicans</i> 10R.	<b>53</b>
<b>Figura 11.</b> Diagramas de caixas contendo os valores para log(ufc/mL) e da	<b>55</b>

absorbância do ensaio do XTT para cepas de *C. glabrata* após aplicação da PDT com curcumina 40 $\mu$ M, em micelas de CTAB: A, *C. glabrata*; B, *C. glabrata* 63R; C, *C. glabrata* 50R.

**Figura 12.** Imagens da cultura de *C. glabrata* 50R após condições experimentais: **56**  
A, FS+L+ 40 $\mu$ M de concentração de curcumina em micelas de CTAB 0,1mM; B, FS+L- 40 $\mu$ M de concentração de curcumina em micelas de CTAB; C, FS-L-.

**Figura 13.** Diagramas de caixas contendo os valores para log(ufc/mL) e da **58**  
absorbância do ensaio do XTT para a espécie *C. glabrata* após aplicação da PDT com curcumina 40 $\mu$ M em solução salina 0,85% e DMSO 10%: A, *C. glabrata* ATCC; B, *C. glabrata* 63R; C, *C. glabrata* 50R.

## Lista de tabelas

	<b>Pag</b>
<b>Tabela 1.</b> Valores médios e desvios-padrão do log(ufc/mL) e do ensaio do XTT para espécie <i>C. albicans</i> de acordo com o tratamento aplicado (CUR/CTAB).	<b>49</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) e do ensaio do XTT para espécie <i>C. albicans</i> de acordo com o tratamento aplicado (CUR/SAL).	<b>52</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) e do ensaio do XTT para espécie <i>C. glabrata</i> de acordo com o tratamento aplicado (CUR/CTAB).	<b>54</b>
<b>Tabela 4.</b> Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) e do ensaio do XTT para espécie <i>C. glabrata</i> de acordo com o tratamento aplicado (CUR/SAL).	<b>57</b>
<b>Tabela 5.</b> Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) para espécie <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> após a PDT de acordo com o tratamento aplicado (CUR/CTAB).	<b>60</b>

## Lista de abreviaturas

<b>PDT</b>	Terapia Fotodinâmica
<b>FS</b>	Fotossensibilizador
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>CUR</b>	Curcumina
<b>LED</b>	Diodo emissor de luz
<b>CMC</b>	Concentração micelar crítica
<b>CTAB</b>	Brometo de cetil-trimetilamônio
<b>PBS</b>	Tampão fosato salino
<b>XTT</b>	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]2H-tetrazolium-carboxanilida

## Sumário

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

<b>1. <u>Introdução</u></b>	<b>Pag</b>
<b>1.1.</b> Justificativa	<b>18</b>
<b>1.2.</b> Revisão Bibliográfica	
<b>1.2.1.</b> Características da <i>Candida</i> e Candidose oral	<b>19</b>
<b>1.2.2.</b> Biofilme	<b>23</b>
<b>1.2.3.</b> Terapia Fotodinâmica (PDT)	<b>25</b>
<b>1.2.4.</b> Curcumina	<b>29</b>
<b>1.2.5.</b> Surfactantes	<b>31</b>
<b>2. <u>Objetivos</u></b>	
<b>2.1.</b> Gerais	<b>37</b>
<b>2.1.1.</b> Específico	<b>37</b>
<b>3. <u>Material e Métodos</u></b>	
<b>3.1.</b> Material	<b>39</b>
<b>3.2.</b> Preparo da curcumina	<b>39</b>
<b>3.3.</b> Preparo da solução curcumina/cetrimida (CTAB)	<b>40</b>
<b>3.4.</b> Reativação dos micro-organismos e obtenção das suspensões celulares	<b>40</b>
<b>3.5.</b> Aplicação da PDT e condições experimentais avaliadas	<b>40</b>
<b>3.6.</b> Avaliação da viabilidade celular	<b>41</b>
<b>3.7.</b> Avaliação da capacidade de adesão e formação de biofilme	<b>42</b>

3.8.	Delineamento experimental	43
3.9.	Análise de dados	43
<b>4.</b>	<b><u>Resultados</u></b>	
4.1.	Espectro de absorvância do FS	46
4.2.	Efeito da PDT mediada pela CUR/CTAB sobre as cepas de <i>C. albicans</i>	48
4.3.	Efeito da PDT mediada pela CUR/SAL sobre as cepas de <i>C. albicans</i>	51
4.4.	Efeito da PDT mediada pela CUR/CTAB sobre as cepas de <i>C. glabrata</i>	54
4.5.	Efeito antifúngico da PDT mediada pela Curcumina em DMSO sobre as cepas de <i>C. glabrata</i>	56
4.6.	Efeito da PDT mediada pela Curcumina em CTAB sobre a capacidade de adesão e formação de biofilme das cepas de <i>Candida</i>	59
	<b><u>Discussão</u></b>	<b>61</b>
	<b><u>Conclusão</u></b>	<b>67</b>
	<b><u>Referências Bibliográficas</u></b>	<b>69</b>
	<b><u>Apêndice</u></b>	<b>93</b>

# ***1. Introdução***

## 1.1. Justificativa

O número de infecções nosocomiais causadas por leveduras do gênero *Candida* está aumentando de maneira considerável nos últimos anos. Frequentemente, estes microorganismos oportunistas são isolados de pacientes imunocomprometidos ou naqueles tratados com terapia antimicrobiana de amplo espectro, estando a candidose associada às altas taxas de mortalidade. Dentre as espécies encontradas, a *Candida albicans* é a com maior prevalência e frequentemente é susceptível aos agentes antifúngicos do grupo azol. Entretanto, o número de espécies mais tolerantes, como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e a *Candida krusei* têm aumentado, provavelmente devido ao maior uso de itraconazol e fluconazol, atualmente os medicamentos antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidose; o que torna necessário a exploração de novas terapias antimicrobianas.

A Terapia Fotodinâmica (PDT) vem se mostrando eficaz para inativar ou reduzir microorganismos patogênicos, prevenindo e evitando doenças sistêmicas e odontológicas, tornando-se, assim, uma alternativa terapêutica para o tratamento antimicrobiano. Para a realização da PDT, os fotossensibilizadores (FS), de origem sintética ou natural, são administrados concomitantes com a exposição à luz. Como exemplo de FS de origem natural podemos citar as porfirinas, que também são encontradas como componentes do sangue, e a curcumina (CUR), um pigmento natural obtida da cúrcuma. Outros corantes, como o azul de metileno e o azul de toluidina, são exemplos de FS de origem sintética que podem ser utilizados para a PDT.

A curcumina, de coloração amarela, é extraída dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., conhecida também como açafrão-da-índia. Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem confirmado o potencial terapêutico da curcumina, como seu efeito antiinflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e antitumoral. Contudo, devido à baixa solubilidade da curcumina em meio aquoso, várias formas para a sua administração têm sido investigadas.

Considerando os efeitos que os surfactantes podem apresentar quando em contato com membranas celulares, como por exemplo, o aumento da sua permeabilidade, é plausível a proposta de que estes compostos, utilizados juntamente com um FS, poderiam melhorar a eficiência da PDT, promovendo a permeação do FS para o meio intracelular e seu efeito fotodinâmico. Além disso, a possibilidade do aumento do tempo de vida do estado eletronicamente excitado do FS com a utilização de surfactantes poderia também ter um papel importante na eficácia da PDT.

## **1.2. Revisão de Literatura**

### **1.2.1. Características da *Candida* e Candidose oral**

A parede celular é responsável pela morfologia final da célula. As espécies de *Candida* podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval (característica das leveduras), também chamada de blastóporo ou blastoconídea, ou podem crescer sob a forma filamentosa através da produção de tubos germinativos resultando na conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de hifas e pseudo-hifas. A maior parte das espécies de *Candida* mostram uma predominância da forma filamentosa em meios com concentração baixa de glicose e elevada de CO<sub>2</sub>. Inversamente, a forma de levedura prevalece quando estas espécies crescem em meios com elevada concentração de glicose e baixa de CO<sub>2</sub> (CARDOSO, 2004).

As leveduras são organismos eucarióticos e a sua membrana plasmática é constituída majoritariamente por lipídios (esteróis) e proteínas. A membrana plasmática pode ser representada pelo modelo denominado de mosaico-fluido (SINGER, *et. al.*, 1972; SINGER, 1974). De acordo com este modelo, a membrana plasmática consiste numa bicamada lipídica intercalada por proteínas globulares, as proteínas globulares transmembrana, e por proteínas globulares extrínsecas ou intrínsecas à membrana. Determinados grupos das proteínas transmembrana localizados no exterior da membrana plasmática ou das proteínas extrínsecas podem ligar-se a polissacarídeos e são, assim, tais proteínas chamadas de glicoproteínas. Estas cadeias de polissacarídeos estão muitas vezes associadas a fenômenos fisiológicos das células (ROBERTSON, *et. al.*, 1981, SMITH, *et. al.*, 1984; SEELIG *et. al.*, 1980; PAPAHDJOPOULOS, *et. al.*, 1979). Na membrana plasmática das leveduras o esterol predominante é o ergosterol, analogamente como o colesterol nas células dos mamíferos (DUBE, *et. al.*, 1973). Esta molécula contribui para diversas funções celulares, sendo importante para a integridade e fluidez da membrana, permitindo que muitas das enzimas da membrana possam exercer corretamente a sua função, incluindo a síntese de quitina, importante para a divisão e crescimento celular (WHITE, *et. al.*, 1998). A parede celular é fundamental e essencial a quase todos os aspectos da biologia e patogenicidade celular das leveduras; age como uma barreira de permeabilidade, e é a sua estrutura que mantém a forma oval de levedura bem como desempenha um funções de mediador nas interações que se estabelecem entre o micro-organismo e o ambiente que o envolve (CHAFFIN, *et. al.*, 1998).

No citoplasma, algumas organelas são delimitadas por membranas de constituição semelhante à membrana plasmática celular, como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas mitocondriais e os vacúolos. Já os ribossomos e os túbulos são apenas agregados de macromoléculas. O núcleo é típico de uma molécula eucarionte, menor, e com menor quantidade de DNA; apresentando algumas histonas e a persistência de um envoltório nuclear e do nucléolo, durante a mitose. A quantidade de DNA ribossomal é muito importante para alguns fungos. O DNA mitocondrial possui grande variedade de tamanho e organização, e a quantidade varia de acordo com a fase de crescimento da célula e o número de mitocôndrias presentes em cada fase. Comparando os níveis de RNA e o DNA, nota-se que o RNA é absolutamente predominante sobre o DNA (SIDRIM; MOREIRA, 1999)

Na cavidade oral a *Candida* spp localiza-se, primeiramente, na parte posterior da língua e outros locais como a mucosa, enquanto o biofilme que cobre superfícies dos dentes é colonizado secundariamente (WEBB, *et. al.*, 1998). Frequentemente, quando o sistema de defesa do hospedeiro está deficiente, o fungo altera sua morfologia do tipo blastosporo - presente na mucosa bucal normal, para o tipo micelial (pseudohifas e hifas - formas invasivas do micro-organismo), causando uma intensa reação imunológica e inflamatória (HUNTER, *et. al.*, 1998). Nesses casos, a *Candida* spp pode tornar-se virulenta, ocasionando infecções, como a candidose oral, manifestada por diferentes formas clínicas, envolvendo um ou mais pontos, até afetar toda a cavidade oral, transformando-se em formas invasivas. A candidose quando associada ao uso de prótese total, também conhecida como estomatite protética, é um processo inflamatório muito comum afetando cerca de 60% de pacientes que fazem uso deste tipo de prótese (GEERTS, *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se que a colocação de prótese removível na cavidade bucal promove um desequilíbrio nos processos homeostáticos locais (LAMFON, *et. al.*, 2005; SHULMAN, *et. al.*, 2005), o que leva a alterações quantitativas e qualitativas da microbiota bucal (GHAMRAWY, *et. al.*, 1976). Além disso, o uso contínuo da prótese associado a uma higienização inadequada promovem condições favoráveis para a proliferação de diversos micro-organismos, principalmente espécies do gênero *Candida* (BUDTZ-JORGENSEN, *et.al.*, 1983; THEILADE, *et al.*, 1988).

A *Candida* spp. é um membro natural da microbiota humana (PERFECT, *et al.*, 2006) com a capacidade de colonizar a pele e as mucosas de pessoas saudáveis. É um comensal do trato gastrointestinal, mucosa oral e vaginal, mas muitas vezes provoca infecções superficiais (MAVOR, *et. al.*, 2005), que podem disseminar e causar a candidose invasiva. O Sistema Norte-americano de Vigilância em Infecções Nosocomiais (*US National Nosocomial Infections*

*Surveillance System*) classifica estes micro-organismos como a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas, atrás apenas de estafilococos coagulase-negativos, *Staphylococcus aureus* e enterococos (COSTA, 2009). A incidência de infecções fúngicas invasivas, particularmente aqueles causados por espécies de *Candida*, tem aumentado em todo o mundo (PFALLER, *et al.* 2003). A *C. albicans* é a espécie de maior prevalência (20–50%) (PEREZOUS, *et al.*, 2005), e a não-*albicans* mais comumente encontrada é a *Candida glabrata* (CARTLEDGE, *et al.*, 1999; HUNTER, *et al.*, 1998; KAUR, *et al.*, 2005), com aproximadamente 15% envolvidas em infecções orais (KAUR, *et al.*, 2005). Hoje a *C. albicans* é considerada o principal patógeno fúngico em seres humanos (KARKOWSKA-KULETA, *et al.*, 2009) sendo esta a espécie patogênica mais virulenta do gênero *Candida* (LEROY, *et al.*, 2009; PFALLER, *et al.* 1998).

Infecções por espécies de *Candida* podem ter uma alta taxa de mortalidade, mesmo após tratamento antifúngico intenso, em função do estado imunológico do paciente, do momento tardio do diagnóstico da infecção e/ou da resistência do agente etiológico aos anti-microbianos (KARKOWSKA-KULETA, *et al.*, 2009). O tratamento da candidose envolve medidas estritas de higiene bucal e a utilização de agentes antifúngicos. Os medicamentos de uso tópico, como a nistatina e o miconazol, são normalmente aplicados nos primeiros episódios de candidose e se mostram efetivos para aliviar os sinais e sintomas clínicos da infecção associada à *Candida* spp. (BANTING *et al.*, 2001; IACOPINO, *et al.*, 1992). A escolha de um tratamento ou a associação de mais de um deles deve ser definida em virtude do grau de infecção decorrente da candidose, das condições de saúde geral e bucal, da idade e do gênero do paciente (WILSON, *et al.*, 1998). No entanto, esses medicamentos ainda mostram resultados efêmeros, pois não eliminam completamente esses micro-organismos (KONSBURG, *et al.*, 1994; OLSEN, *et al.*, 1975; BUDTZ-JORGENSEN, *et al.*, 1974). Essa deficiência da ação farmacológica na cavidade bucal, por exemplo, ocorre associada à diminuição da concentração do agente tópico nos sítios infectados, causada pelos efeitos diluentes da saliva e pelos movimentos da língua (BANTING *et al.*, 2001; SAMARANAYAKE, *et al.*, 1990; MACFARLANE, *et al.*, 1989). Assim, os micro-organismos não são expostos de forma apropriada aos antimicóticos, pois a concentração é variável para diferentes locais da boca.

Antifúngicos sistêmicos, tais como os compostos azólicos, também são utilizados (MIMA, *et al.*, 2011). No entanto, fármacos como itraconazol estão associados com interações medicamentosas e requerem um monitoramento cuidadoso dos pacientes (KOKS, *et al.*, 2002) e o aumento do uso de azóis, aliado ao fato de que eles têm apenas a atividade fungistática,

resultou no desenvolvimento de resistência a esses fármacos. Além disso, espécies como a *C. glabrata* e a *C. krusei* são intrinsicamente resistentes aos medicamentos antifúngicos e vêm sendo freqüentemente isoladas de infecções (COLOMBO & GUIMARÃES, 2007). Também tem sido relatado que as espécies de *Candida* possuem a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos fármacos por meio de mutações genéticas nestas células (WHITE, *et. al.*, 1998). O desenvolvimento de resistência ao fluconazol por espécies de *Candida* tem surgido em determinadas populações, especialmente em pacientes portadores do HIV (WHITE, *et. al.*, 1998; JOHNSON, *et. al.*, 1995).

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, e expressos pelos micro-organismos quando submetidos a certas condições ambientais favoráveis, tais como teor nutricional, níveis de oxigênio na atmosfera e temperatura apropriada (TAMURA *et al.*, 2007; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Essas condições são específicas para cada micro-organismo e podem variar de hospedeiro para hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Todavia, se as defesas do hospedeiro forem adequadas, o micro-organismo pode ser eliminado ou conviver em aparente harmonia e sem sintomatologia, por prolongado período de tempo. Em caso contrário, o processo infeccioso leva a alterações nocivas, estabelecendo-se uma relação de parasitismo (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1997).

Neste sentido, a patogenicidade da *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência, como variabilidade fenotípica, aderência aos tecidos do hospedeiro, produção de hifas, toxinas (KOMIYAMA *et al.*, 2007) e, destaca-se como um dos principais mecanismos de virulência, a produção de enzimas extracelulares, como proteinases e fosfolipases (CANDIDO; AZEVEDO; KOMESU, 2000). Essas enzimas são responsáveis pela propagação do fungo no hospedeiro, facilitando a invasão, através da degradação das membranas celulares pela atividade hidrolítica (SILVEIRA *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2005; THIELE, 2005).

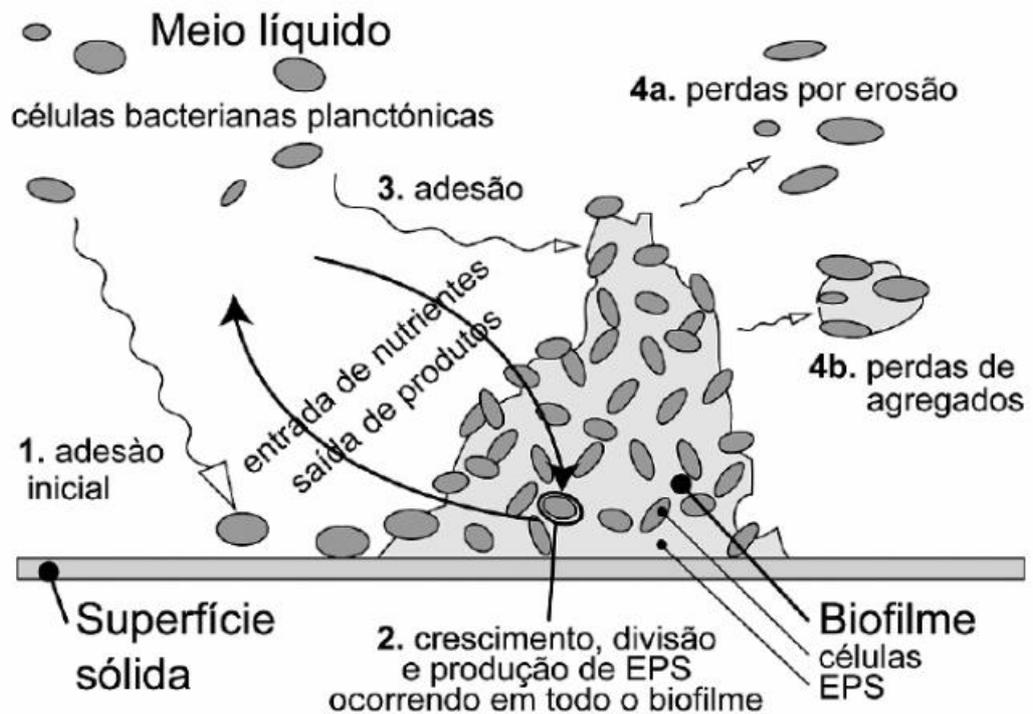
As fosfolipases têm um papel ativo na invasão do tecido do hospedeiro em lesões por *Candida* spp., rompendo a membrana das células epiteliais e permitindo a penetração das hifas no citoplasma (THIELE, 2005). Enzimas proteolíticas fazem parte do sistema metabólico de um grande número de organismos vivos, podendo ser isoladas de animal, vegetal ou de micro-organismos e são classificadas como proteinases e peptidases (SILVEIRA *et al.*, 2006). A

proteínase é produzida principalmente pelas espécies mais patogênicas de *Candida* spp., como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (KOMIYAMA *et al.*, 2007). Sendo assim, a produção de proteínases é indicada como um dos fatores possivelmente relacionados à instalação e posterior disseminação do fungo infectante no hospedeiro. Postula-se que as proteínases extracelulares de tais fungos podem ser importantes na aderência e persistência do patógeno nas superfícies de mucosas, na invasão dos tecidos do hospedeiro e na digestão de imunoglobulinas (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1997). A aspartil-protease aumenta a capacidade do fungo de colonizar e penetrar nos tecidos degradando um número importante de proteínas do hospedeiro para prover o nitrogênio à suas próprias células. O mecanismo de patogenicidade dessa enzima é a digestão das estruturas de superfície das células do hospedeiro bem como das proteínas de matriz extracelular. Além disso, a aspartil-protease também promove a destruição das células do sistema imunológico do hospedeiro (THIELE, 2005).

### **1.2.2. Biofilme**

Os micro-organismos estão presentes nos mais diversos habitats e são capazes de desenvolver comportamentos bem complexos. São encontrados nos ambientes aquosos naturais, tanto na forma planctônica como na forma sésil (COSTERTON *et al.*, 1987; TRULEAR & CHARACKLIS, 1982). Na forma planctônica os micro-organismos encontram-se em suspensão e dispersos no meio aquoso, enquanto que, na forma sésil encontram-se aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes. O biofilme é uma comunidade estruturada de micro-colônias de células microbianas envolvida por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderida a um substrato sólido úmido, ou a uma superfície sólida em contato com um meio líquido, de onde podem retirar seus nutrientes (COSTERTON *et al.*, 1999).

A formação e acumulação de biofilmes é resultado de processos físicos, químicos e biológicos, que compreendem o transporte de micro-organismos livres em meio líquido para uma superfície e sua posterior fixação, o crescimento e multiplicação de células fixas obtendo nutrientes do meio, juntamente com a produção e secreção de extra-polissacarídeos (EPS), havendo, também, fixação de outras células e partículas, contribuindo assim para a produção do biofilme. Esse processo pode ser melhor visualizado na Figura 1.



**Figura 1.** Etapas da formação de um biofilme (Adaptado de Xavier, et. al., 2003)

A matriz de EPS tem importante função também em armazenar nutrientes e água, os quais interagem com os grupos neutros e com carga desses polissacarídeos, além disso também protegem os micro-organismos da resposta imune e dos agentes antimicrobianos (COSTERTON, *et. al.*, 1995; O'TOOLE, *et.al.*, 2000; MAH, *et. al.*, 2001). Estudo experimental *in vitro* revelou que células bacterianas em biofilmes são mais resistentes a antibióticos do que células da mesma espécie no estado planctônico (CERI *et al.* 2001).

Em estudo desenvolvido por Davies, *et al.*, 1998 com *Pseudomonas aeruginosa* em biofilme cultivado em fluxo laminar, o autores observaram ser o *quorum sensing* importante para a formação da estrutura em biofilmes. O *Quorum sensing* é postulado como um mecanismo para regulação de determinadas atividades celulares, como a produção de metabolitos secundários de modo dependente da densidade celular, observado em culturas planctônicas (SALMOND *et al.* 1995), ou seja, uma forma de “comunicação” intercelular.

O farnesol, um sesquiterpenóide, foi identificado como uma molécula produzida por *Candida albicans*, na transição do tipo leveduriforme para o tipo micelial em altas concentrações e na formação do biofilme (HORNBY, *et. al.*, 2001; RAMAGE, *et. al.*, 2002). O estudo desenvolvido por Navarathna, *et. al.*, 2007, mostrou que o farnesol aumenta a virulência da *C. albicans* em modelo de infecção em ratos. Em outros estudos, há indícios de que o farnesol é empregado pelas espécies de *Candida* para reduzir a competição com outros micro-

organismos, uma vez que este composto intervém na apoptose em fungos filamentosos, como o *Aspergillus nidulans* (SEMIGHINI, *et. al.* 2006), e inibe a formação de biofilme em outras espécies de *Candida* (JABRA-RIZK, *et. al.*, 2006; ROSSIGNOL, *et. al.*, 2007).

O mecanismo de transferência de plasmídios, conhecido como conjugação, ocorre numa velocidade maior entre as células residentes em biofilmes em relação às células livres (EHLERS & BOUWER, 1999; HAUSNER & WUERTZ, 1999; ROBERTS *et al.* 1999), e micro-organismos de relevância clínica contendo determinados plasmídios demonstram uma maior tendência para a formação de biofilmes (GHINGO, 2001).

Na cavidade bucal dos seres humanos, atualmente já foram detectadas cerca de 1000 diferentes espécies de micro-organismos e maior parte delas encontra-se organizada na forma de biofilmes (WILSON, 2004).

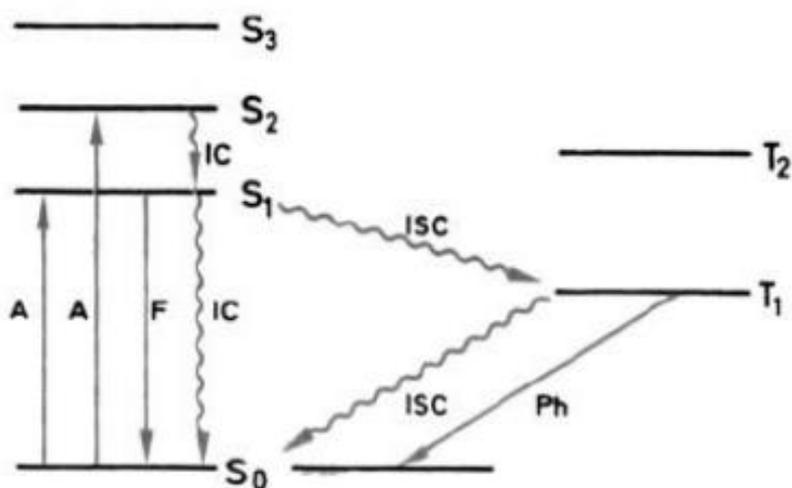
A importância clínica e acessibilidade para pesquisas *in vivo* fazem da placa dentária uma das comunidades em biofilme mais estudadas e melhor compreendidas. Pesquisas têm mostrado que o desenvolvimento destas comunidades microbianas é um processo que envolve a cooperação e/ou competição em uma população extremamente diversificada de micro-organismos (KOLENBRANDER, *et. al.*, 2002).

### **1.2.3. Terapia Fotodinâmica (PDT)**

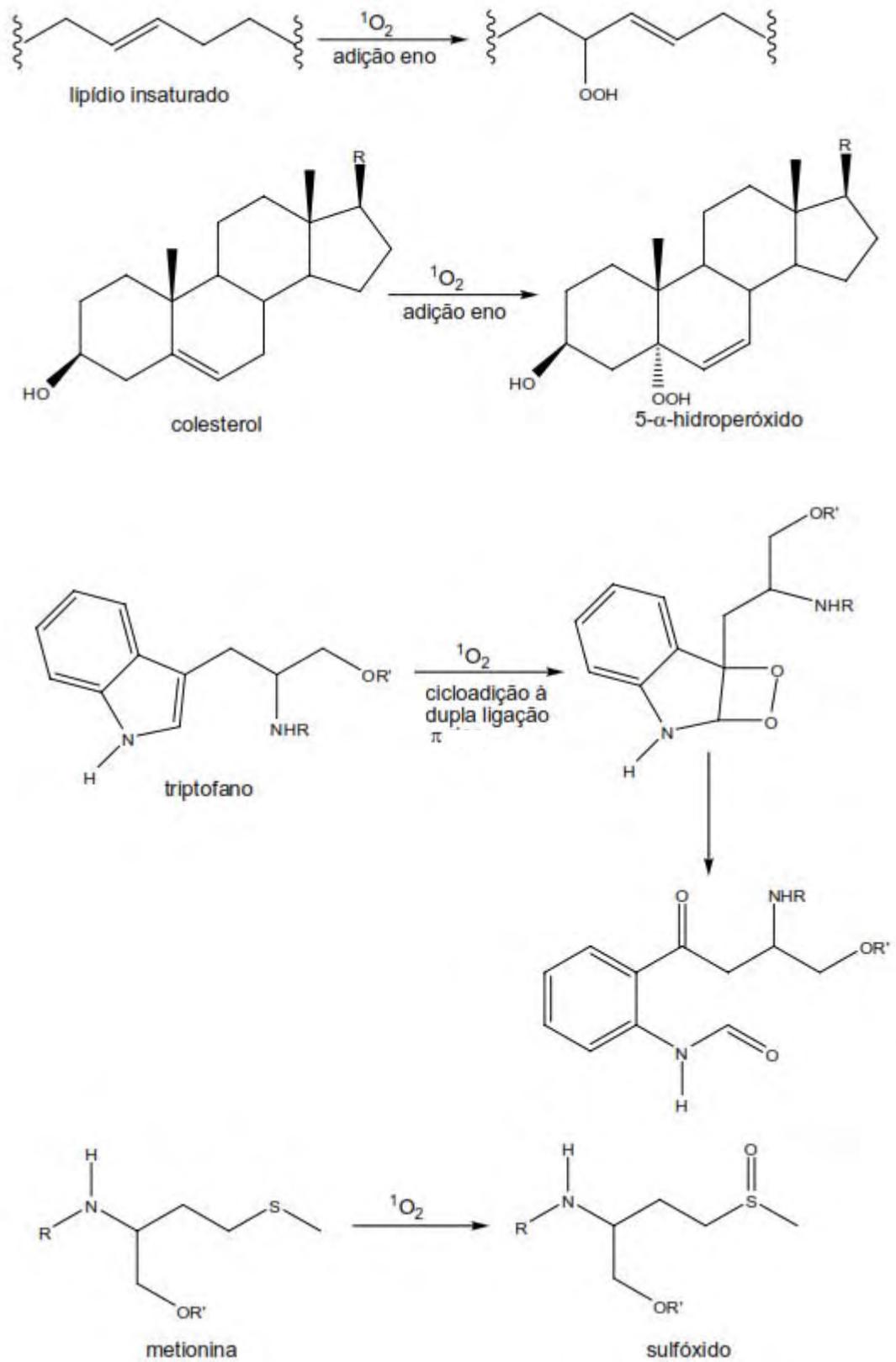
Diante das dificuldades impostas pelo surgimento da resistência microbiana, muitos estudos vêm sendo conduzidos explorando terapias alternativas para o tratamento de infecções como a candidose. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos patogênicos é a Terapia Fotodinâmica (*Photodynamic Therapy* ou PDT) (BURNS, *et. al.*, 1994; DESIMONE, *et. al.*, 1999; DOBSON, *et. al.*, 1992; OKAMOTO, *et. al.*, 1992; WILSON *et. al.*, 1994; WILSON *et. al.*, 1993). Essa técnica vem sendo desenvolvida para o tratamento de lesões cancerosas e aplicada com sucesso na oncologia com a promoção de danos irreversíveis às células neoplásicas (MACHADO, *et. al.*, 2000). Recentemente, estudos têm demonstrado o potencial da PDT na inativação microbiana, incluindo alguns tipos de vírus, bactérias e fungos (MACHADO, *et. al.*, 2000, DOVIGO *et. al.*, 2011a; DOVIGO *et. al.*, 2011b)

Essa terapia tem seu mecanismo fundamentado na fotoquímica e necessita da presença de um composto fotoativo, denominado de fotossensibilizador (FS), e uma fonte de luz na região visível do espectro eletromagnético, onde ocorre a sua absorção pelo FS utilizado

(ALEXIADES-ARMENAKAS, *et. al.*, 2006; COLUSSI, *et. al.*, 1996; MACHADO, *et. al.*, 2000). Este, por sua vez, ao absorver energia radiativa, torna-se eletronicamente excitado (Figura 2), e assim pode gerar fotoproduto(s) e/ou na presença de oxigênio, gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (MACHADO, *et. al.*, 2000), como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ânion radical superóxido e outras ERO, os quais promovem a morte celular (COLUSSI, *et. al.*, 1996). Essas espécies eletronicamente excitadas e/ou ERO são altamente reativas às biomoléculas, incluindo o colesterol, acilas insaturadas das camadas lipídicas das membranas, resíduos de aminoácidos tais como a cisteína, histidina e triptofano das proteínas, bem como bases de ácidos nucleicos do DNA (BAGNATO, 2008), e podem promover a oxidação irreversível dos componentes celulares como a oxidação de membranas e inativação de proteínas (BONNETT, 1995; HENDERSON & DOUGHERTY, *et. al.*, 1992). Algumas dessas reações envolvendo o  $^1\text{O}_2$  e biomoléculas são mostradas na Figura 3.



**Figura 2.** Diagrama de Jablonski representa possíveis processos fotofísicos no FS, onde  $S_0$  = estado eletrônico fundamental,  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$  = estados eletronicamente excitados singlete,  $T_1$ ,  $T_2$  = estados eletronicamente excitados tripleto, **A** = absorção, **F** = fluorescência, **Ph** = fosforescência, **IC** = conversão interna, **ISC** = cruzamento intersistemas.



**Figura 3.** Reações do oxigênio singlete com biomoléculas (Adaptado de Bonnett, 1995).

Entre as vantagens da PDT estão, teoricamente, sua efetividade em todos os tipos de câncer, dispensando a necessidade de especificidade dos agentes quimioterapêuticos e a utilização de radiação ionizante. Comparada com outras terapias citotóxicas, a PDT pode ter a vantagem de dupla seletividade: o FS pode ser direcionado para as células ou tecido alvo via processos imunológicos, e a luz visível pode ser também precisamente focalizada no local da lesão (HAMBLIN, *et al.*, 2004; DEMIDOVA, *et al.*, 2004; BAGNATO, 2008). O procedimento pode ser repetido várias vezes, se necessário, uma vez que não há efeitos tóxicos cumulativos e usualmente não é invasivo (PERUSSI, *et al.*, 2007).

Há mais de 100 anos, Raab (1900) publicou o primeiro artigo sobre efeitos fotodinâmicos com eosina e o alaranjado de acridina sobre micro-organismos. A aplicabilidade dessa técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários bem antes da Segunda Guerra Mundial, mas foi abandonada, devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina. O retorno da aplicação para terapia antimicrobiana utilizando PDT nos últimos tempos é resultado do crescente aumento de infecções, entre elas, as hospitalares, devido à resistência bacteriana aos fármacos.

Estudos realizados nos anos de 1990 por Wilson, Dobson e Harvey *et al.* mostravam que um grande número de bactérias bucais, incluindo-se as periodontopatogênicas e as cariogênicas eram susceptíveis a essa terapia. Dessa forma, a PDT foi adaptada, e passou a ser utilizada para tratamentos clínicos bucais. Espécies como *Staphylococcus mutans*, *Staphylococcus sobrinus* (WILSON, DOBSON, SARKAR, 1993; SOUKOS, WILSON, BURNS *et al.*, 1996; USACHEVA, TEICHERT, BIEL, 2001; BEVILACQUA, NICOLAU, KHOURI *et al.* 2007; BURNS, WILSON, PEARSON, 1995), *Staphylococcus salivarius*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (DAHL, MIDDEN, NECKERS, 1988) e duas cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* (DOVIGO *et al.*, 2007) foram inativados eficientemente através da PDT.

Dovigo *et al.* em 2009, avaliaram a efetividade da PDT na inativação de suspensões celulares e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* ATCC e resistentes ao fluconazol, por meio da utilização do Photogem® como FS e da iluminação com LED de comprimento de onda azul (455 nm). Neste estudo, as suspensões planctônicas de cepas de *Candida* resistentes a fluconazol foram totalmente inativadas pós-PDT. Em estudo posterior, Dovigo, *et al.*, 2011, utilizaram a curcumina e PDT para *C. albicans*. A solução estoque de curcumina foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em solução fisiológica em diferentes concentrações de curcumina e expostas a diferentes doses de luz. As propriedades fotofísicas da curcumina foram

investigadas em função da dose de iluminação e esse ensaio mostrou que a habilidade da curcumina em absorver luz diminuiu progressivamente com o aumento do tempo de iluminação, indicando um efeito de fotodegradação. As melhores respostas do tratamento foram selecionadas para avaliar o tempo de “pré-incubação” (PIT) à exposição à luz, um parâmetro que pode indicar a eficácia da interação entre a curcumina e as células de *C. albicans*; a PDT mediada pela curcumina também foi avaliada em biofilmes microbianos. Além dos ensaios fotofísicos e microbiológicos, protocolos semelhantes foram testados numa linhagem celular de macrófagos e o efeito desses protocolos foi avaliado via ensaios com brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e SEM análise. Houve uma significativa redução na viabilidade de *C. albicans* após a PDT e os valores de ufc/mL foi dependente da concentração do FS. Nos ensaios em solução planctônica, as maiores concentrações de curcumina foram as mais efetivas na ação fotodinâmica e a morte completa desses micro-organismos foi encontrada com 20µM de curcumina e dose de luz de 37,5J/cm<sup>2</sup>; o PIT de 20 minutos promoveu uma melhor eficácia da PDT. Em biofilmes também foi encontrado uma redução da viabilidade em todas as concentrações do FS utilizadas. A relação direta entre a concentração de curcumina e a viabilidade do biofilme também foi observada.

#### **1.2.4. Curcumina**

Nas últimas décadas, tem sido observado um grande interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (YUNES, *et al.*, 2001). Tal fato é comprovado pela evidência de que hoje, cerca de 30% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 50% dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, como os análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN & CARTER, 2005).

A cúrcuma é uma planta herbácea e perene da família Zingiberaceae, tendo como origem o sul da Índia, e cultivada na China, Kuwait, Índia, Indonésia, Sri Lanka, Filipinas, Caribe, Norte da Austrália e América do Sul. De cultivo fácil, apresenta a vantagem de não exigir tratamentos de cultivo especiais, podendo desenvolver-se em condições tropicais, em altitudes que variam do nível do mar a 1500 m, e temperaturas de 20 a 30 °C, sob regime pluvial de 150 cm<sup>3</sup> ou mais por ano ou sob irrigação, preferencialmente sob solo argiloso ou aluvial, fértil e rico em matéria orgânica (GOVINDARAJAN, 1980; MILÁN, 1992; SCARTEZZINI &

SPERONI, 2000). Seu uso foi introduzido pelos mercadores árabes, na Idade Média, quando a cúrcuma era conhecida como “açafraão indiano” (RICHARD & LOO, 1992).

O gênero *Curcuma* é constituído por centenas de espécies de plantas (GOVINDARAJAN, 1980). No Brasil a *Curcuma longa* L. é conhecida como cúrcuma, batatinha amarela, gengibre dourado, mangarataia, açafraão da terra ou açafraão da Índia. Na Índia é denominada *haldi*, nas Filipinas *dilau*, na Alemanha *gelbwurzel* e *gurgemei*, na França *safran des Indes* e *souchet des Indes* e em países de língua inglesa *turmeric* e *yellow root* (CORREA, 1975; GOVINDARAJAN, 1980; MARTINS & RUSIG, 1992; MILÁN, 1992). O componente presente em maior teor (25 a 50%) é o amido, seguido de proteína (4 a 10%), fibras e cinzas (2 a 7%), pigmentos curcuminóides e os óleos essenciais (GONVINDARAJAN, 1980). Os pigmentos curcuminóides majoritários encontrados na cúrcuma são: a curcumina (CUR), a dimetoxicurcumina (DMC) e a bisdimetoxicurcumina (BDMC); suas concentrações variam de 4 a 6 mg/100 g, 3 a 4 mg/100 g e 2 a 3 mg/100 g, respectivamente (MARTINS & RUSIG, 1992).

A curcumina é comumente usada como condimento na culinária asiática tradicional, na medicina chinesa, bem como, já estão descritas diversas propriedades farmacológicas, tais como ação antiinflamatória, antitumoral, antifúngica, antibacteriana e anticarcinogênica (MARTINS, *et. al.*, 2009; PRIYADARSINI, *et. al.*, 2009; SHARMA, *et. al.*, 2005).

Cort (1974), avaliando atividade antioxidante de várias espécies de plantas, observou ser a cúrcuma uma das mais potentes; além disso, Ramaswamy & Banerjee (1948) propuseram ser o grupamento fenólico da curcumina, o responsável por tais propriedades. Estudos “in vitro” também mostraram outros efeitos da curcumina, como o antiparasitário (ARAÚJO, 2001), como promotor da desintoxicação hepática pela inibição da glutathione S-transferase (HAYESHI, 2007; KISO, 1983) e propriedades anti HIV, pela inibição da HIV-integrase (MELO, *et. al.*, 2005; MAZUMDER, 1995). Ensaio em laboratório ainda demonstraram ser a cúrcuma antimutagênica, pois ajuda a evitar novos focos potenciais de câncer, causados por quimioterapia ou radioterapia, além de inibir a metástase em câncer de pele (MEHTA, 1997; MENON, 1999), reduz inflamações devido à diminuição de níveis de histamina e possivelmente pelo aumento da produção natural de cortisona pelas glândulas adrenais (AMMOM, *et. al.*, 1993).

Com relação à estabilidade da curcumina, Tonnensen & Karlsen, 1985 verificaram que a curcumina é instável em pH maior que 7,0. Resultados semelhantes foram observados por Rusig & Martins, 1992 os quais constataram a faixa de pH entre 4 e 7 como a que proporcionou

maior estabilidade à molécula curcumina e que em pH superior a 7, a velocidade de degradação foi significativamente maior. Como outras atividades biológicas, a curcumina age como antiinflamatório e antioxidante. A angiogênese, processo associado ao crescimento do tumor, é inibida pela curcumina. Essa substância afeta ainda as proteínas relacionadas à adesão célula-célula e inibe a produção de citocinas relevantes ao crescimento tumoral (BAE, *et. al.*, 2006).

Algumas dessas propriedades têm sido ampliadas com a exposição à luz (KOON, *et. al.*, 2006; TONNESEN, *et. al.* 1987; DOVIGO, *et al.*, 2011a ). Para a curcumina, a luz azul é uma opção interessante para sua fotoativação (ANDRADE, *et. al.*, 2011). A faixa azul do espectro de luz (440-485 nm) é capaz de promover sua excitação eletrônica (ALEXIADES-ARMENAKAS, *et. al.*, 2006), sendo que a absorção máxima ocorre por volta dos 420 nm. Esta faixa espectral é comumente utilizada nos consultórios odontológicos para fotopolimerização das resinas, por meio do uso de aparelhos do tipo LED (diodo emissor de luz) ou de luz halógena (ANDRADE, *et. al.*, 2011).

### **1.2.5. Surfactantes**

A curcumina é muito pouco solúvel em meio aquoso, sendo assim, torna-se necessário a utilização de adjuvantes para aumentar sua solubilidade, como solventes apróticos (DMSO) ou surfactantes, entre outros.

Os surfactantes são produtos muito utilizados nas indústrias químicas, aparecendo em uma série de segmentos, tais como processos de refino de petróleo, em produtos farmacêuticos e domissanitários (PEREIRA, *et. al.*, 2009). Estão presentes em amaciantes de tecidos e como inibidor de corrosão (BINKS, 2011; SINGH, 2009), são ingredientes de xampus e condicionadores de cabelo (BOETHLING, 1984; LEVINSON, 1999; CROSS, 1994), agem como fungicidas, pesticidas e inseticidas (ZIELINSKI, 2005), revelam atividades antibacterianas e antifúngicas, sendo usados como agentes antimicrobianos (BELALIA, *et. al.*, 2008; RABEA, *et. al.*, 2003; MCDONNELL, *et. al.*, 1999). Na área ambiental, os surfactantes são usados na preparação de argila organofílica que tem diversas aplicações, inclusive na síntese de nanomateriais (SARKAR, *et. al.*, 2010(a), 2010(b), 2011).

A palavra surfactante deriva da expressão “surface active agent” e é um composto orgânico que contém na mesma molécula dois grupos estruturais diferentes, um solúvel em água (grupo polar ou hidrofílico) e o outro insolúvel em água (grupo apolar ou hidrofóbico). Os surfactantes são classificados em aniônicos, catiônicos e não iônicos, de acordo com a

ionização ou não do seu grupo polar (CROSS, 1997). São muito utilizados em produtos industriais com aplicações farmacêuticas e na proteção ambiental (STWPHENSON, 2006).

Quando dissolvidas em água, as moléculas do surfactante se auto-associam em agregados micelares, com suas caudas hidrofóbicas protegidas da água no interior dos agregados, e a sua cabeça hidrofílica expostas a água na superfície desses agregados. Esta auto-associação é impulsionada principalmente pelas interações hidrofóbicas, embora interações de van der Waals, pontes de hidrogênio, também desempenhem um papel importante na micelização (ISRAELACHVILI, 1991). A concentração inicial da auto-associação é denominada concentração micelar crítica (CMC). Em geral a CMC é muito bem definida e se torna menor quanto mais longa for a cadeia alquílica do surfactante, sendo os primeiros agregados formados são geralmente de forma esférica, com raio da ordem do comprimento das caudas do surfactante (JÖNSSON *et al*, 1998).

Embora a toxicidade de determinados surfactantes como os compostos quaternários de amônio (QAS) para bactérias, protistas e animais já tenham sido relatadas (SARKAR, *et. al.*, 2010c; GARCIA, *et. al.*, 1999; GARCIA, *et. al.*, 2001; NAL ECZ-JAWECKI, *et. al.*, 2003), a maioria destes compostos foram considerados como não-tóxicos ou de baixa toxicidade (SINGH, *et. al.*, 2009; THORSTEINSSON, *et. al.*, 2003, COLOMER, *et. al.*, 2011; BOOJI, *et. al.*, 2000); portanto, são seguros para uso em humanos (DMOCHOWSKA, *et. al.*, 2011).

Os grupos hidrofílicos em surfactantes catiônicos tornam-se carregados positivamente em solução aquosa como acontece com a cetrimida (CTAB) ou brometo de cetiltrimetilamônio (PEREIRA, 2009). Este surfactante é um QAS e estudos de 1950/60 desenvolvidos por Kutscher, *et. al.*, 1954, Kutscher, *et. al.*, 1956 e Amato, *et. al.*, 1968 já demonstraram que o CTAB inibe o crescimento de linhagens patogênicas de *Candida albicans*. Segundo Armstrong, 1957, a ação tóxica inicial de diferentes compostos catiônicos em leveduras, é a desorganização da membrana celular, seguida da inativação de enzimas intracelulares. Além disso, acima de uma determinada concentração, o surfactante pode acarretar um aumento na permeabilidade da membrana (LICHTENBERG, *et. al.*, 1979) sem, entretanto, causar qualquer dano na sua estrutura geral (UENO, 1992). Em estudo desenvolvido por Howe *et al*, 1998, foi observado que o tempo de vida do estado excitado para o FS fitalocianina de zinco tetrasulfonato (ZnPcS4) aumenta com a concentração do CTAB. Isto sugere que o equilíbrio na solução aquosa entre as formas polimérica/monômero do FS é deslocada para a forma monomérica. Estudos desenvolvidos anteriormente, foi visto também um aumento na prevalência de monômeros do ZnPcS4 em micelas de CTAB e, conseqüentemente, um aumento no rendimento

quântico na geração de oxigênio singlete durante a irradiação (SPIKES, & BOMMER, 1986). Esses resultados sugerem que a presença de CTAB aumenta a troca de energia entre os estados triplete-singlete de oxigênio. Assim, a utilização de sistemas micelares com surfactantes, como carregadores para direcionar o princípio ativo à região alvo, de maneira eficiente e rápida tem sido constantemente explorada. Estes sistemas apresentam assim maior solubilização, prevenção da agregação de monômeros do FS e manutenção das propriedades fotofísicas dos compostos hidrofóbicos (MALMSTEN, 2002).

Mandy *et. al.*, 2008 avaliaram a encapsulação da curcumina como um método efetivo para suprimir sua hidrólise alcalina. Eles utilizaram como sistemas micelares os surfactantes catiônicos CTAB e brometo dodecil trimetilamônio (DTAB) e um surfactante aniônico, o dodecil surfato de sódio (SDS). As concentrações micelares utilizadas foram para o DTAB 30,6mM, para o SDS 16,2mM e para o CTAB 1,84mM, preparados em água pura. Uma solução de curcumina em metanol foi usado como estoque e alíquotas foram adicionadas na solução micelar, obtendo duas concentrações finais de curcumina. Dentre os resultados obtidos pelos autores, verificou-se que a taxa de degradação da curcumina desprotonada ( $\text{Cur}^{3-}$ ) foi significativamente menor em micelas catiônicas do que quando em solução aquosa. Em micelas de CTAB e em DTAB, as taxas de degradação foram  $101 \pm 71,8$  e  $93,6 \pm 85,6$  nM/h, respectivamente. A relação entre a taxa de degradação em solução aquosa e em micelas de CTAB indica que a degradação é aproximadamente 8 vezes menor em micelas de CTAB. Em outras palavras, a presença de micelas de CTAB suprime a degradação da  $\text{Cur}^{3-}$  com rendimento de supressão de  $87,4 \pm 16,4\%$ ; enquanto que micelas de CTAB ou DTAB suprimem a degradação da  $\text{Cur}^{3-}$ , as micelas compostas por surfactantes aniônicos, como o SDS, não foram efetivas. Os autores postulam que este efeito é devido à eficiente encapsulação da  $\text{Cur}^{3-}$  em micelas catiônicas e que a rápida degradação de  $\text{Cur}^{3-}$  em micelas de SDS indica que a  $\text{Cur}^{3-}$  é dissociada de micela para a fase aquosa. As intensidades fluorométricas da  $\text{Cur}^{3-}$  em micelas de DTAB e em CTAB são de 1 ordem maior de magnitude do que em solução aquosa, e estes dados estão de acordo com as propriedades fluorescentes da curcumina em pH natural.

Lyin, *et. al.* 2010 avaliaram o efeito dos surfactantes cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), SDS, *N*-hexadecil-*N*'-dimetil-3-amonio-propano-sulfonato (HPS) e octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100) na viabilidade, capacidade de adesão e produção de exoenzimas por espécies de *Candida*. Foram utilizadas cepas de referência: *C. albicans* ATCC 18804, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 20298. Além dessas cepas, dez amostras de *C. albicans*, dez de *C. glabrata*, oito

de *C. tropicalis*, cinco de *C. parapsilosis* e três de *C. krusei* obtidas da cavidade oral de pacientes com estomatite protética foram também avaliadas. As soluções de surfactantes foram preparadas em água e diluídas em Sabouraud Dextrose Broth (SDB) em diferentes concentrações. Soluções padronizadas dos micro-organismos foram assim expostas a diferentes concentrações de surfactantes. Dessa forma, a concentração mínima inibitória (MIC) dos surfactantes foi determinada e verificou-se efeito de inibição de crescimento ou morte celular, através da contagem de colônias. Para a avaliação da capacidade de adesão, foram utilizadas células epiteliais da mucosa bucal (BEC) de adultos saudáveis. Em meio tamponado com solução fisiológica foram ajustadas as concentrações da suspensão de levedura e das BEC e incubadas sob agitação a 37°C/1h. Foi investigado também as atividades de proteinases e fosfolipases. Entre todos os surfactantes testados, o CTAC e o HPS foram os que inibiram completamente o crescimento de 90% dos isolados de espécie de *Candida* com um MIC menor; a MIC do CTAC de 0,78µg/mL foi observada para todas as espécies testadas, e para o HPS, foi observado 3,12 µg/mL para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. Krusei* e 1,56µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para capacidade de aderência, todos os surfactantes utilizados causaram uma diminuição no número de células aderidas às BEC, entretanto, uma redução significativa foi obtida por CTAC e HPS em todas as concentrações testadas. As *C. albicans* ensaiadas não demonstraram alteração na atividade da fosfolipase após sua exposição ao tratamento com surfactantes, em qualquer concentração. A atividade da proteinase em CTAC foi inibida com *C. albicans*, tanto nas cepas de referência quanto aqueles de isolados clínicos. Enquanto os halos formados nos testes controles foram de 2 e 3mm de diâmetro, após o tratamento, esses halos não estavam presentes. A atividade da proteinase para as cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi inibida após a exposição ao CTAC em todas as concentrações utilizadas. Similarmente ao ocorrido com *C. albicans*, a exposição a outros surfactantes não alterou a atividade da proteinase.

Armstrong em 1956 explorou a ação de detergentes catiônicos no metabolismo, nos efeitos citolíticos e na produção de CO<sub>2</sub> em leveduras de Beker. Para isso, seis surfactantes foram utilizados: CTAB, cloreto de citilpiridinium, cloreto de cetildimetilbenzilamônio e Bradosol; surfactantes aniônicos também foram utilizados afim de comparação. Como resultado, o autor verificou que concentrações de detergente maiores do que 2x10<sup>-3</sup>M, foram capazes de inibir o metabolismo por completo em todos os casos. A diminuição da porcentagem de células viáveis pode ser observada quando a concentração de surfactante utilizada foi de 1,6x10<sup>-3</sup>M. Na produção de CO<sub>2</sub> por essa levedura, verificou-se que esta

diminui com o aumento da concentração do surfactante. A inibição mais efetiva encontrada foi com o cloreto de cetildimetilbenzilamonio e o bradosol, com o CTAB e o cloreto de cetilpiridinio ocupando posição intermediária.

## 2. Objetivos

## **2.1. Gerais**

Avaliar o efeito da PDT mediada pela Curcumina, utilizando o CTAB como surfactante, com uma fonte de luz do tipo LED, sobre suspensões plantônicas de isolados clínicos das espécies *C. albicans* e *C. glabrata fluconazol-resistentes*, bem como em cepas ATCC. Também foi avaliada a capacidade de adesão/formação de biofilme após a PDT com curcumina e surfactante.

### **2.1.1. Específicos**

- i) Avaliar a viabilidade celular através da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) nas suspensões planctônicas, na ausência e presença de CTAB.
- ii) Avaliar a atividade metabólica nas suspensões planctônicas via o ensaio com XTT na ausência e presença de CTAB.
- iii) Avaliar a capacidade de adesão e formação de biofilme após a PDT quando o fotossensibilizador estiver em micelas de CTAB, através da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/mL).

# 3. Material e Métodos

### **3.1. Material**

Para a realização da PDT, foi utilizado a Curcumina (Fluka/Sigma) na ausência e presença de micelas de CTAB. A iluminação foi realizada com aparelho de luz tipo LED de  $22\text{mW/cm}^2$ , no comprimento de onda de  $440\pm 30\text{nm}$ . O aparelho LED utilizado nos estudos foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP) de São Carlos, colaborador deste trabalho.

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram: cultura de *Candida albicans* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA Número (ATCC 90028); cultura de *Candida glabrata* proveniente da empresa American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, EUA Número (ATCC 2001); duas culturas de isolados clínicos de *Candida albicans*, com resistência a fluconazol, identificações: 15R e 10R e duas culturas de isolados clínicos de *Candida glabrata*, com resistência a fluconazol, identificações: 50R, 63R. Todas as cepas resistentes são provenientes do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brasil. A confirmação da resistência ou susceptibilidade das cepas testadas ao fluconazol foi feita através do Eteste AB BIODISK (Solna, Suécia), seguindo as normas do fabricante.

As características fotofísicas da solução de curcumina em micelas e na ausência de CTAB foram investigadas em função da dose de luz utilizada (ou tempo de iluminação). Uma solução de curcumina  $40\mu\text{M}$  foi iluminada e a capacidade de absorção de luz da solução foi aferida antes e após a iluminação nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 29 minutos, que correspondem a 1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20; 26,4 e  $37,5\text{J/cm}^2$ , respectivamente. O espectro de absorção foi obtido com a utilização do equipamento UV-Visible Spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian).

### **3.2. Preparo da Curcumina**

Uma solução estoque de curcumina ( $200\mu\text{M}$ ) foi preparada em DMSO e então diluída em solução de NaCl (0,85%) para obtenção da concentração final do ensaio (mantendo-se a concentração final de DMSO em 10%). A concentração de 10% de DMSO foi selecionada por não haver efeitos sobre a viabilidade da *Candida* (DOVIGO, *et al.*, 2012).

Na avaliação da PDT na ausência de surfactante, a solução foi preparada diluindo-se a solução estoque de curcumina com solução salina (CUR/SAL) para que a concentração de DMSO não fosse alterada.

### **3.3. Preparo da solução Curcumina/Cetrimida (CUR/CTAB)**

Uma solução estoque de CTAB, 0,25mM foi preparada dissolvendo a massa de 0,0273g em 10mL de salina fisiológica e uma alíquota foi utilizada para obter-se uma concentração final no ensaio de 0,1mM. Com uma micro-seringa de vidro, uma alíquota da solução estoque de curcumina foi injetada para obter uma concentração final de curcumina a 40µM. A curcumina foi injetada na solução de CTAB para acelerar a incorporação da mesma nas micelas.

A solução foi preparada em temperatura ambiente, antes dos ensaios. A escolha da concentração do CTAB foi determinada previamente, não apresentando qualquer efeito sobre as células fúngicas, tanto na presença quanto na ausência de luz.

### **3.4. Reativação dos micro-organismos e obtenção das suspensões celulares**

Inicialmente, cada isolado foi reativado sobre a superfície do meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) durante 48h a 37°C. Em seguida, com ajuda de alça estéril, uma colônia do micro-organismo foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5mL de meio TSB (tryptic soy broth) e o tubo foi incubado (37°C) durante aproximadamente 16h. Após a incubação, as células fúngicas foram centrifugadas a 5000rpm durante 7min, e lavadas duas vezes com 4mL de PBS (tampão fosfato-salino). Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS para o ajuste da concentração celular. O ajuste da concentração celular foi realizado em espectrofotômetro com leitura em 520nm. Inicialmente, o equipamento foi calibrado com PBS estéril e alíquotas da suspensão celular foram adicionadas até que o valor de absorbância fosse de 0,380, equivalente a  $10^6$  células/mL.

### **3.5. Aplicação da PDT e condições experimentais avaliadas**

Para a investigação do efeito da curcumina na ausência e na presença de micelas de CTAB, as mesmas condições descritas abaixo foram utilizadas:

#### **A) FS+L+**

Para cada cepa de *Candida* utilizada, alíquotas de 100µL da solução de suspensão celular padronizada foram adicionadas em cada orifício da placa de 96 poços e em seguida, a mesma quantidade de FS acrescentado. A placa foi deixada em repouso no escuro durante 20

minutos (pré-incubação). Após esse período, os orifícios foram iluminados com o LED uniforme e simultaneamente.

#### **B) FS+L-**

Para que fosse avaliado o efeito apenas da curcumina sobre os micro-organismos, foi incluído neste estudo amostras contendo o FS e que não foram iluminadas com o LED. Para cada cepa de *Candida* utilizada, foi utilizado o mesmo procedimento de FS+L+, mas na ausência de luz do LED.

#### **C) FS-L-**

Nesta condição experimental, as suspensões celulares de cada micro-organismo não foram submetidas aos procedimentos da PDT. Alíquotas de 80µL da solução de CTAB em salina estéril ou apenas a solução salina e 20µL de DMSO foram transferidas para os orifícios contendo as suspensões celulares. A placa foi deixada em repouso durante 20 minutos no escuro, e então deixada sobre a bancada no escuro pelo mesmo tempo equivalente a mesma dose de luz (tempo equivalente à dose de luz aplicada nas amostras FS+L+).

### **3.6. Avaliação da viabilidade celular**

O metabolismo celular para todas as condições experimentais foi avaliado por meio do ensaio de redução do 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]2H-tetrazolium-carboxanilida (XTT). O XTT (sal amarelo) é reduzido, por desidrogenases mitocondriais das leveduras metabolicamente ativas, a uma formazana, monitorada espectrofotometricamente. Para o ensaio do XTT, a solução estoque de XTT foi preparada utilizando-se água ultra pura, a uma concentração de 1mg/ml e mantida a -70 °C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4mM, imediatamente antes de cada experimento. O preparo da solução de XTT/Menadiona seguiu as seguintes proporções: 158µL de PBS glicosado, 40µL de XTT (1mg/ml) e 2µL de Menadiona a 0,4mM (da Silva WJ, Seneviratne J, *et. al.*, 2008).

Para a realização do ensaio do XTT, a CUR/CTAB ou CUR/SAL (condições FS+L+ e FS+L-) ou apenas solução salina/DMSO ou salina/DMSO/CTAB (condição FS-L-) que estava em contato com as células em suspensão, ou seja, a matriz da PDT, foi removida após

centrifugação e ao pellet foi adicionado uma solução de XTT. Após homogeneização dos tubos eppendorfs, o conteúdo foi transferido para placas e estas foram incubadas no escuro a 37°C por 3h, e, em seguida uma alíquota de 100µL do sobrenadante com ou sem o produto da redução do XTT de cada orifício foi transferida para um orifício de uma placa de leitura, e a absorbância foi determinada por espectrofotometria em 492nm.

Para todas as condições avaliadas, diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> foram obtidas de cada orifício e em seguida semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura SDA (Sabouraud Dextrose Agar) com 5µg/mL de cloranfenicol. Adicionalmente, alíquotas de 25µL foram removidas das cavidades das placas de orifícios e transferidas diretamente para um quadrante da placa de Petri, sem a realização de diluição. Os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicatas; após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri foram submetidas à contagem de colônias e os números de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) foram calculados.

Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\text{Ufc/mL} = \frac{\text{número de colônia} \times 10^n}{q}$$

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas.

### **3.7. Avaliação da Capacidade de Adesão e Formação de biofilme**

Para que fosse feito os testes de fatores de virulência após a PDT na presença de micelas, as condições experimentais FS+L+ e FS-L- foram ensaiadas.

As mesmas condições experimentais acima foram feitas e após 48hrs de crescimento dos micro-organismos em placas de SDA após a PDT, as células foram retiradas e postas para crescer em 5mL de meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) e incubadas sob agitação a 37°C/16hrs. Após este procedimento, foram feitas lavagens com PBS e alíquotas de 100µL da suspensão celular padronizada (10<sup>6</sup> células/mL) foram transferidas para uma placa com 96 orifícios e incubada em agitador orbital durante 1h30min, a 37°C e 75rpm. Esse período de incubação permite a adesão das células no fundo dos orifícios (fase de adesão). Em seguida, foram realizadas duas lavagens dos orifícios com PBS (150µL) para remoção das células que não aderiram ao fundo dos orifícios. Finalmente, foram adicionados 150µL de meio RPMI em cada

orifício e a placa foi incubada à 37°C durante 48h. Após este período, onde ocorreu ou não a formação do biofilme, o meio de cultura foi removido e os orifícios foram lavados duas vezes com PBS para remoção das células não aderidas. Para cada momento do ensaio (adesão/formação) foram feitas diluições seriadas como citadas acima e as placas foram submetidas à contagem de colônias.

### **3.8. Delineamento experimental**

A pesquisa consistiu de estudo experimental em laboratório e foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, foi investigado o efeito antimicrobiano promovido pelo tratamento fotodinâmico. Como variáveis independentes avaliaram-se a espécie de *Candida* (*C. albicans* e *C. glabrata*), as diferentes cepas (uma ATCC e dois isolados clínicos com resistência a fluconazol para cada espécie), a formulação do fotossensibilizador (CUR/CTAB e CUR/SAL) e o tratamento aplicado (FS+L+, FS+L- e FS-L-). Para avaliar o efeito antimicrobiano sobre os micro-organismos, duas variáveis dependentes foram selecionadas: o metabolismo celular (XTT) e o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/ml). Da associação entre as variáveis independentes obteve-se 36 grupos de estudo, que foram divididos para possibilitar a análise dos dados de acordo com as diferentes perguntas da pesquisa.

Na segunda etapa da pesquisa, foi investigado o efeito do tratamento fotodinâmico mediado pela CUR/CTAB na capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície abiótica das cepas em estudo. Como variáveis independentes avaliaram-se a espécie de *Candida* (*C. albicans* e *C. glabrata*), as diferentes cepas (uma ATCC e dois isolados clínicos com resistência a fluconazol para cada espécie) e o tratamento aplicado (FS+L+ e FS-L-). Para quantificar os micro-organismos aderidos e no interior dos biofilmes, o número de ufc/ml foi avaliado como variável dependente. Nesta etapa foram avaliados 24 grupos de estudo, sendo 12 para avaliação da capacidade de adesão e 12 para avaliação da formação de biofilme.

### **3.9. Análise dos Dados**

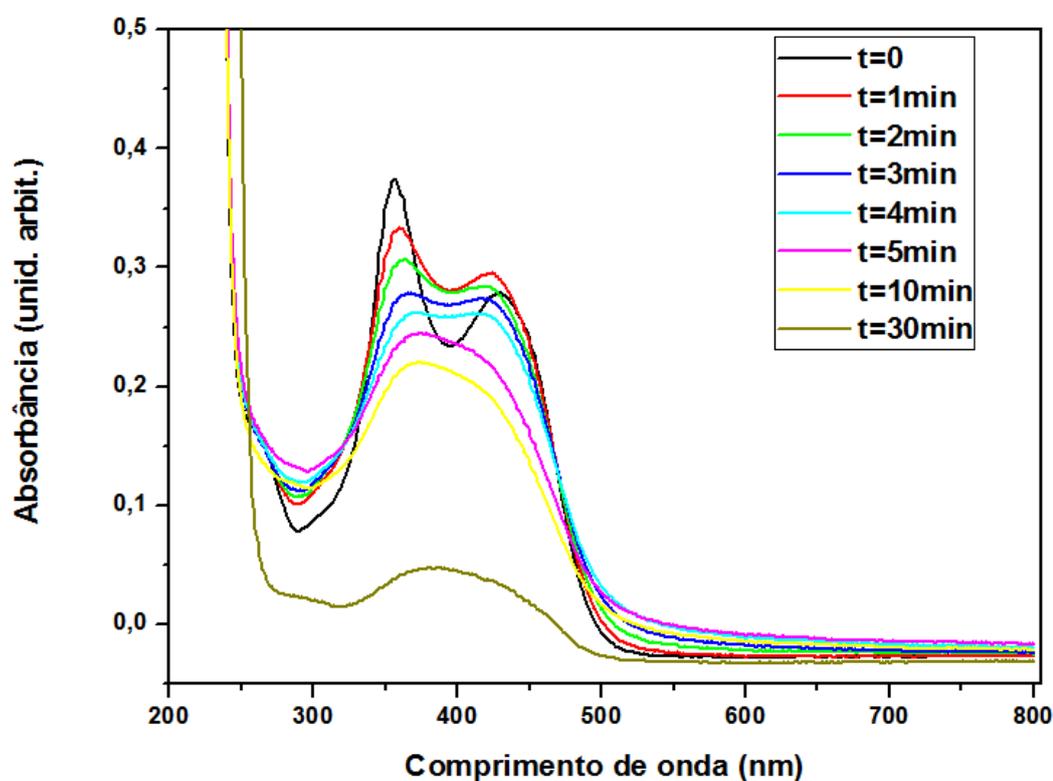
Por se tratarem de variáveis dependentes do tipo quantitativas contínuas, a análise estatística descritiva foi iniciada por meio do cálculo das principais medidas de resumo. Os valores de ufc/mL foram transformados em logaritmo de base 10. O pressuposto de normalidade não foi atendido em todos os grupos de estudo, assim como também não foi observada homogeneidade de variâncias. Por se tratar de um experimento com grupos

balanceados e de um delineamento em blocos que acarreta em um tamanho amostral suficientemente grande, optou-se por utilizar a análise paramétrica dos dados, tendo em vista que esse tipo de análise é robusta à violação dos pressupostos no cenário apresentado <sup>Maroco J.</sup>. Assim, os dados foram submetidos à Análise de Variância a dois critérios (Cepa e Tratamento), seguida do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05.

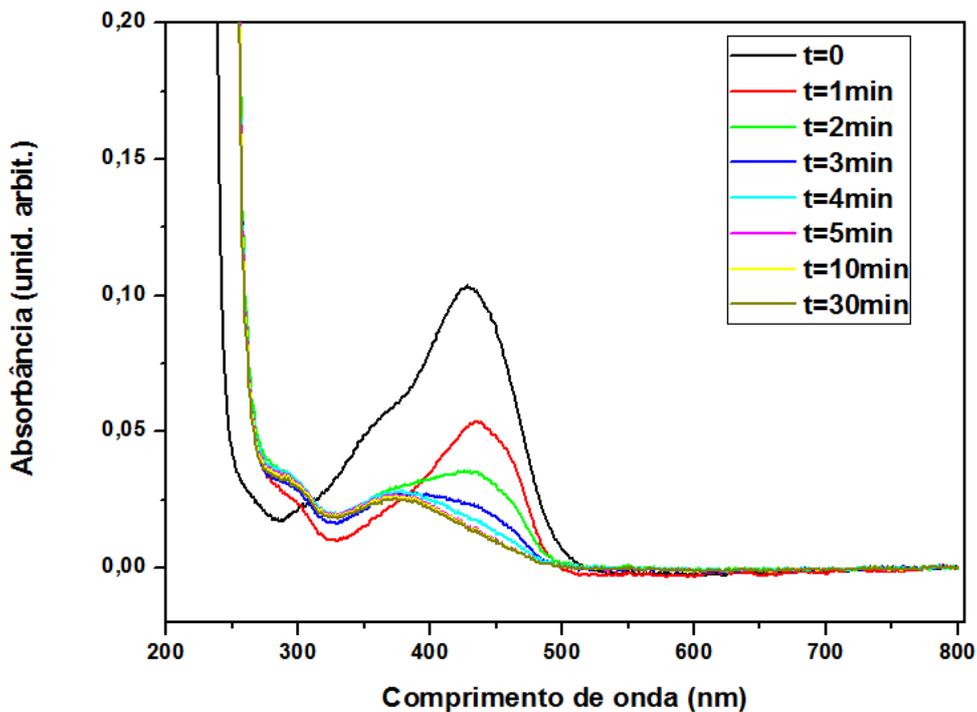
## 4. Resultados

#### 4.1. Espectro de absorbância do FS

Os espectros de absorção de luz do FS utilizado estão mostrados nas Figuras 4 e 5. A CUR/CTAB apresentou dois picos principais de absorção de luz, sendo que no pico de interesse (~455nm) sua absorbância foi aproximadamente 2 vezes maior em comparação ao CUR/SAL. Também é possível observar que a fotodegradação dos FSs foi mais pronunciada para a CUR/SAL, especialmente com 10 min de iluminação. Esse resultado foi também observado visualmente, pois a coloração amarela da CUR foi mantida na solução CUR/CTAB, enquanto que a solução de CUR/SAL tornou-se transparente. Após 30 min, a absorbância do FS nas duas condições foi próxima à zero.

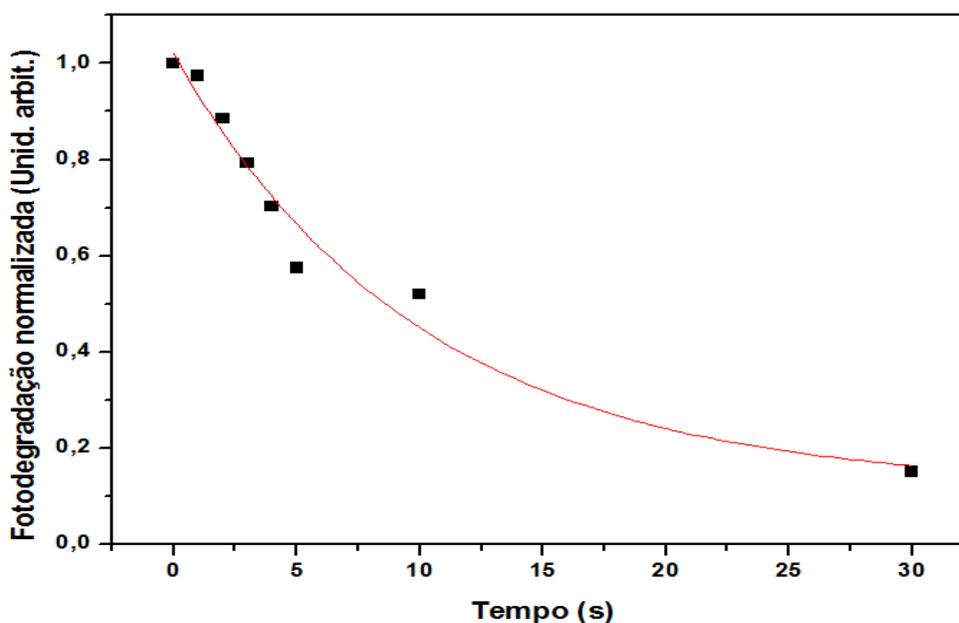


**Figura 4:** Variação temporal da absorção da curcumina 40 $\mu$ M em solução salina de NaCl 0,85%, DMSO 10% e CTAB 0,1mM.

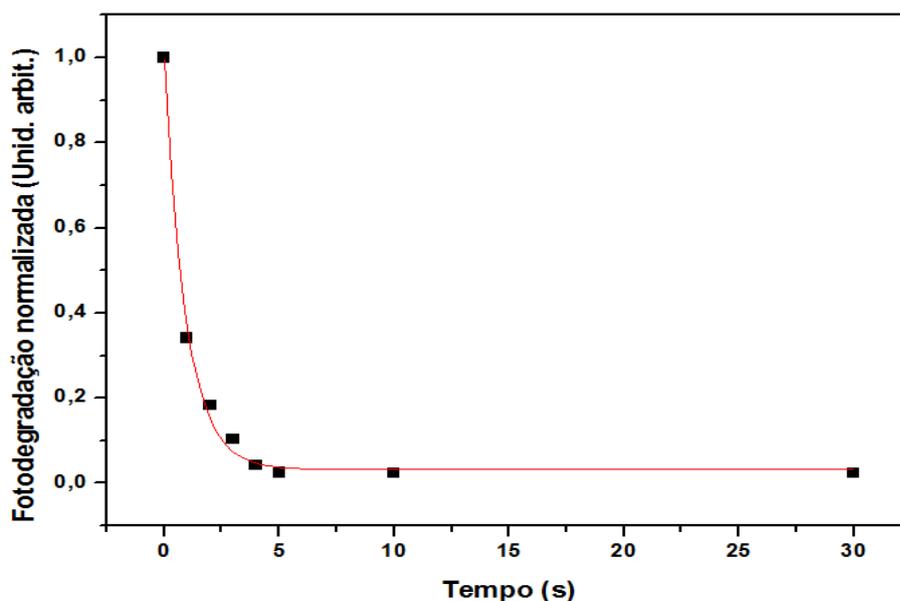


**Figura 5:** Variação temporal da absorção da curcumina 40 $\mu$ M em solução salina de NaCl 0,85%, DMSO 10%.

Todas as curvas de absorção foram integradas (com o software Microcal Origin 7.5<sup>TM</sup>), e, dessa forma, foram calculadas as áreas de cada perfil de absorção. Os valores da integral normalizada, em relação às doses de luz avaliadas, foram dispostos segundo uma curva de decaimento.



**Figura 6:** Integrais normalizadas dos espectros de absorção de curcumina 40 $\mu$ M em CTAB 0,1mM, solução salina 0,85% e DMSO 10% para os tempos de 0 a 30 min.



**Figura 7:** Integrais normalizadas dos espectros de absorvância de curcumina 40 $\mu$ M em solução salina 0,85% e DMSO 10% para os tempos de 0 a 30 min.

#### **4.2. Efeito da PDT mediada pela CUR/CTAB sobre as cepas de *C. albicans***

Os valores originais para as células viáveis (ufc/mL) e do ensaio do XTT obtidos após a PDT com a curcumina em CTAB estão apresentados nas Tabelas A1 e A2 do apêndice deste trabalho.

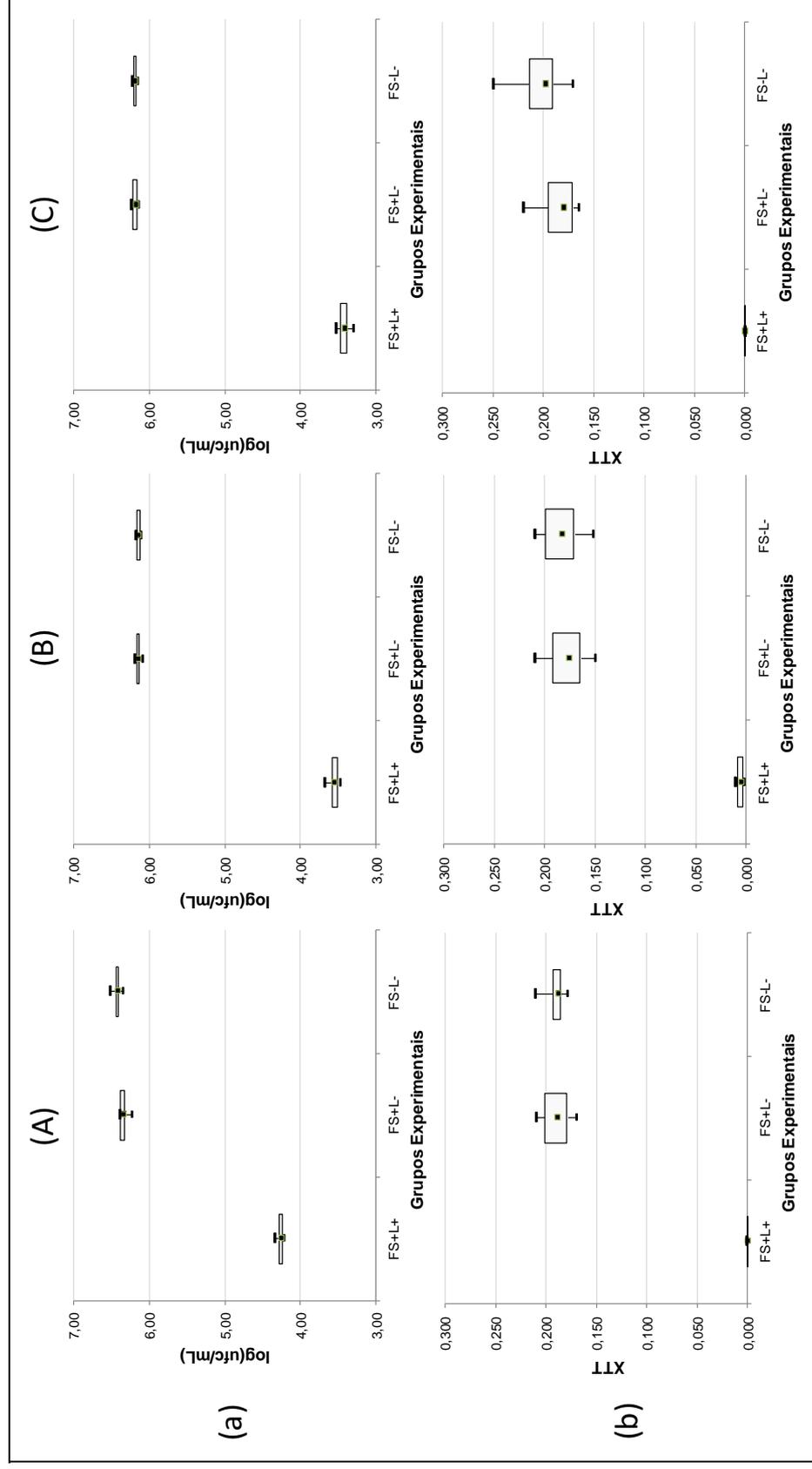
A Figura 8 mostra os dados para as variáveis  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  e de absorvância para o ensaio do XTT. As comparações múltiplas entre médias mostraram que a PDT (grupo FS+L+) promoveu redução significativa na viabilidade de todas as cepas, em relação ao grupo FS-L- (Tabela 1). Além disso, ao se comparar os valores de  $\log(\text{ufc/mL})$  entre as três cepas no grupo FS+L+, foi observado que o efeito antifúngico observado com pelo CTAB foi mais pronunciado nas duas cepas resistentes a fluconazol, já que estas últimas mostraram valores de  $\log(\text{ufc/mL})$  significativamente inferiores em relação a cepa ATCC. Os valores para o ensaio do XTT no grupo FS+L+ foram significativamente inferiores aos valores do grupo FS-L- em todas as cepas, enquanto que não houve diferença nos valores de XTT entre as cepas em relação à aplicação da PDT. Esse resultado parece ter sido corroborado pelas características macroscópicas observadas no crescimento das cepas 10R e 15R submetidas a PDT e cultivadas em meio de cultura, já que as colônias se apresentavam de menor diâmetro e com coloração menos opaca em relação às amostras controle (Figura 9).

De forma geral, não foi observada alteração significativa nos valores de log(ufc/mL) e XTT quando o FS foi utilizado sem iluminação (grupos FS+L-) em relação ao grupo FS+L+, confirmando que o efeito antifúngico só ocorreu quando houve a associação do FS e luz.

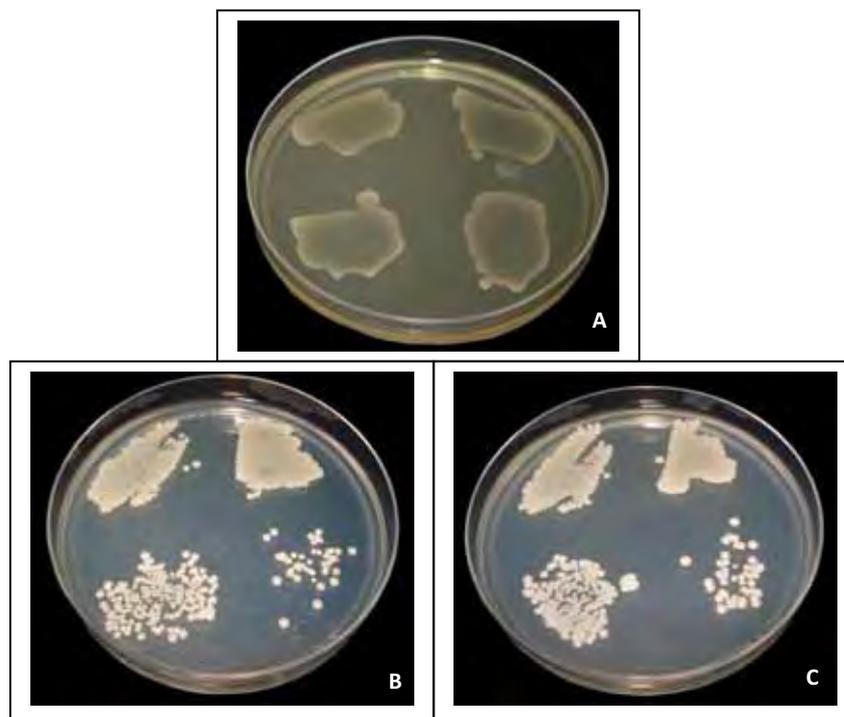
**Tabela 1.** Valores médios e desvios-padrão do log(ufc/mL) e do ensaio do XTT para espécie *C. albicans* de acordo com o tratamento aplicado (CUR/CTAB).

Variável	Cepa	Tratamento											
		FS+L+			FS+L-			FS-L-					
log(ufc/mL)	ATCC	4,26	<sup>aA</sup>	±	0,04	6,34	<sup>aB</sup>	±	0,05	6,42	<sup>aC</sup>	±	0,04
	15R	3,56	<sup>bA</sup>	±	0,07	6,15	<sup>bB</sup>	±	0,03	6,14	<sup>bB</sup>	±	0,02
	10R	3,42	<sup>cA</sup>	±	0,08	6,19	<sup>bB</sup>	±	0,03	6,20	<sup>bB</sup>	±	0,02
XTT	ATCC	0,00	<sup>aA</sup>	±	0,00	0,19	<sup>aB</sup>	±	0,01	0,19	<sup>abB</sup>	±	0,01
	15R	0,01	<sup>aA</sup>	±	0,00	0,18	<sup>aB</sup>	±	0,02	0,18	<sup>aB</sup>	±	0,02
	10R	0,00	<sup>aA</sup>	±	0,00	0,19	<sup>aB</sup>	±	0,02	0,20	<sup>bC</sup>	±	0,02

<sup>a,A</sup> Letras maiúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma linha. Letras minúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma coluna, na mesma variável.



**Figura 8.** Diagramas de caixas contendo os valores para log(ufc/mL) e da absorbância do ensaio do XTT para cepas de *C. albicans* após aplicação da PDT com curcumina 40µM, em micelas de CTAB: A, *C. albicans* ATCC; B, *C. albicans* 15R; C, *C. albicans* 10R.



**Figura 9.** Imagens da cultura de *C. albicans* 10R após as condições experimentais: A, FS+L+ curcumina 40 $\mu$ M, em micelas de CTAB 0,1mM; B, FS+L- curcumina 40 $\mu$ M, em micelas de CTAB; C, FS-L-.

#### **4.3. Efeito da PDT mediada pela CUR/SAL sobre as cepas de *C. albicans***

Os valores originais de ufc/mL e XTT obtidos após a avaliação da CUR/SAL estão apresentados nas Tabelas A5 e A6 do apêndice deste trabalho.

A Figura 10 mostra os resultados para as variáveis  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  e do XTT. A PDT promoveu a completa inativação da cepa ATCC, tendo em vista os valores nulos de  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  e XTT observados somente para esse micro-organismo na condição FS+L+.

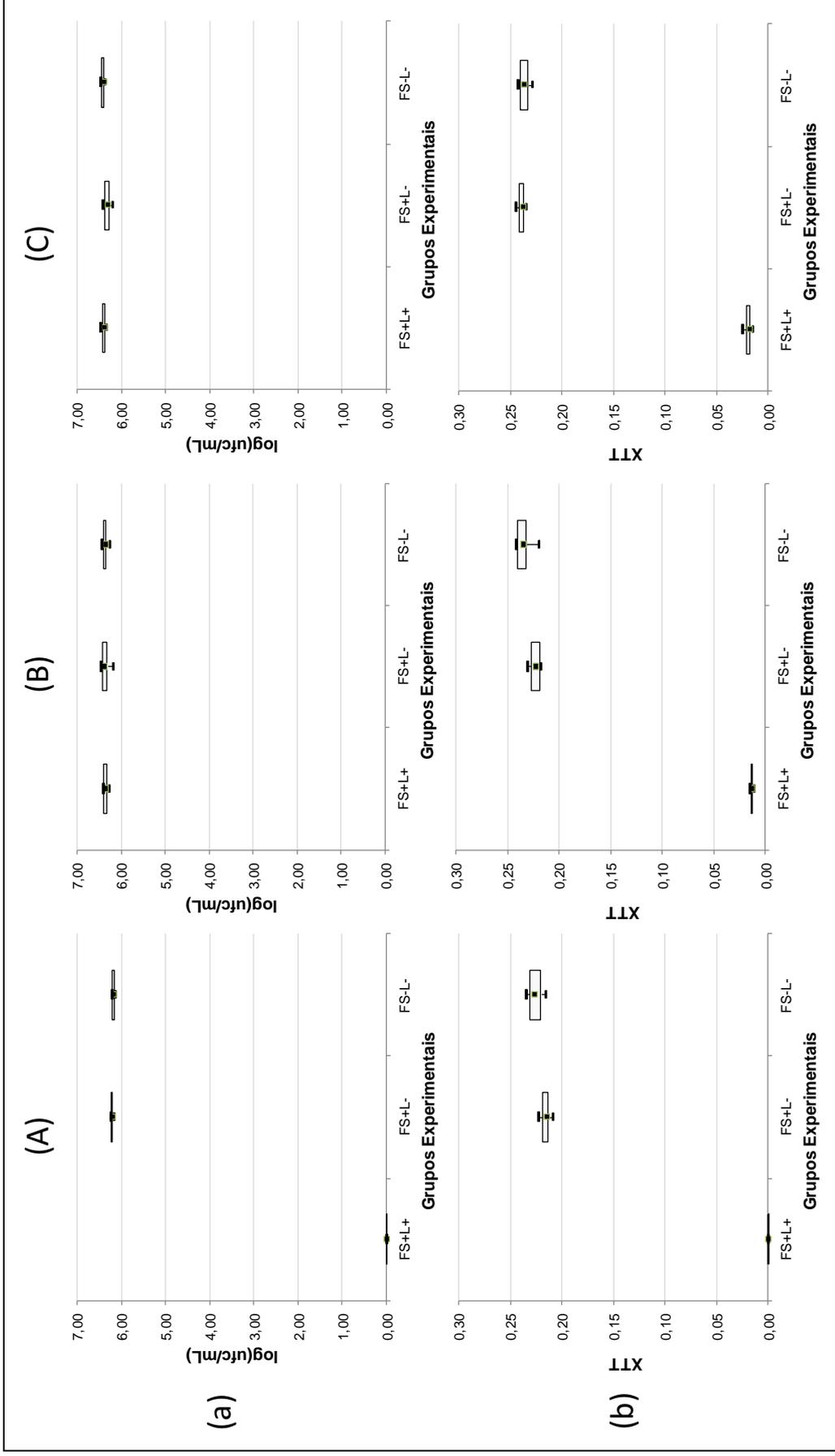
As comparações múltiplas entre médias mostraram que o valor médio de  $\log(\text{ufc/mL})$  no grupo FS+L+ foi significativamente inferior ao valor do grupo FS-L- apenas para a cepa ATCC (Tabela 2). Dessa forma, a PDT mediada pela CUR/SAL não foi capaz de promover efeito fungicida significativo nas cepas resistentes ao fluconazol. Em todas as cepas, não foi observada alteração significativa nos valores de  $\log(\text{ufc/mL})$  quando o FS foi utilizado sem iluminação (grupos FS+L-).

Apesar disso, a avaliação da variável do ensaio do XTT mostrou que o metabolismo de todas as cepas foi reduzido significativamente após a aplicação da PDT (grupo FS+L+), em relação ao metabolismo do grupo FS-L- (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) e XTT para espécie *C. albicans* de acordo com o tratamento aplicado (CUR/SAL).

Variável	Cepa	Tratamento					
		FS+L+		FS+L-		FS-L-	
log(ufc/mL)	ATCC	0,00	<sup>aA</sup> ± 0,00	6,21	<sup>aB</sup> ± 0,02	6,18	<sup>aB</sup> ± 0,03
	15R	6,36	<sup>bA</sup> ± 0,05	6,37	<sup>bA</sup> ± 0,09	6,37	<sup>bA</sup> ± 0,05
	10R	6,40	<sup>bA</sup> ± 0,04	6,32	<sup>bA</sup> ± 0,07	6,42	<sup>bA</sup> ± 0,04
XTT	ATCC	0,00	<sup>aA</sup> ± 0,00	0,22	<sup>aB</sup> ± 0,00	0,23	<sup>aC</sup> ± 0,01
	15R	0,01	<sup>bA</sup> ± 0,00	0,22	<sup>bB</sup> ± 0,00	0,24	<sup>bC</sup> ± 0,01
	10R	0,02	<sup>cA</sup> ± 0,00	0,24	<sup>cB</sup> ± 0,00	0,24	<sup>bB</sup> ± 0,00

<sup>a,A</sup> Letras maiúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma linha. Letras minúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma coluna, na mesma variável.



**Figura 10.** Diagramas de caixas contendo os valores para log(ufc/mL) e da absorbância do ensaio de XTT para cepas de *C. albicans* após aplicação da PDT com curcumina 40µM em solução salina 0,85% e DMSO 10%: A, *C. albicans* ATCC; B, *C. albicans* 15R; C, *C. albicans* 10R.

#### 4.4. Efeito da PDT mediada pela CUR/CTAB sobre as cepas de *C. glabrata*

Os valores originais de ufc/mL e do ensaio do XTT obtidos após a PDT com curcumina CUR/CTAB estão apresentados nas Tabelas A1 e A2 do apêndice deste trabalho.

A Figura 11 os valores das estatísticas descritivas calculadas para as variáveis  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  e para o ensaio do XTT. Para a variável ufc/mL, as comparações múltiplas entre médias detectaram diferença significativa entre os grupos FS+L+ e FS-L- para todas as cepas, indicando a ocorrência de efeitos fototóxicos para todos os micro-organismos (Tabela 3). Apesar disso, a redução da viabilidade foi mais acentuada para a cepa 50R, em comparação com as cepas ATCC e 63R. Somente para a cepa ATCC foi verificada redução estatisticamente significativa na viabilidade após a utilização do FS na ausência de luz. No entanto, a redução observada nos valores foi muito pequena ( $0,07\log(\text{ufc/mL})$ ) e não parece ter nenhuma importância prática. Da mesma forma como ocorrido nas cepas resistentes de *C. albicans*, as cepas resistentes de *C. glabrata* também apresentaram modificações morfológicas em suas colônias, mostrando que a utilização do surfactante durante a PDT promoveu algum tipo de modificação na sua estrutura celular (Figura 12).

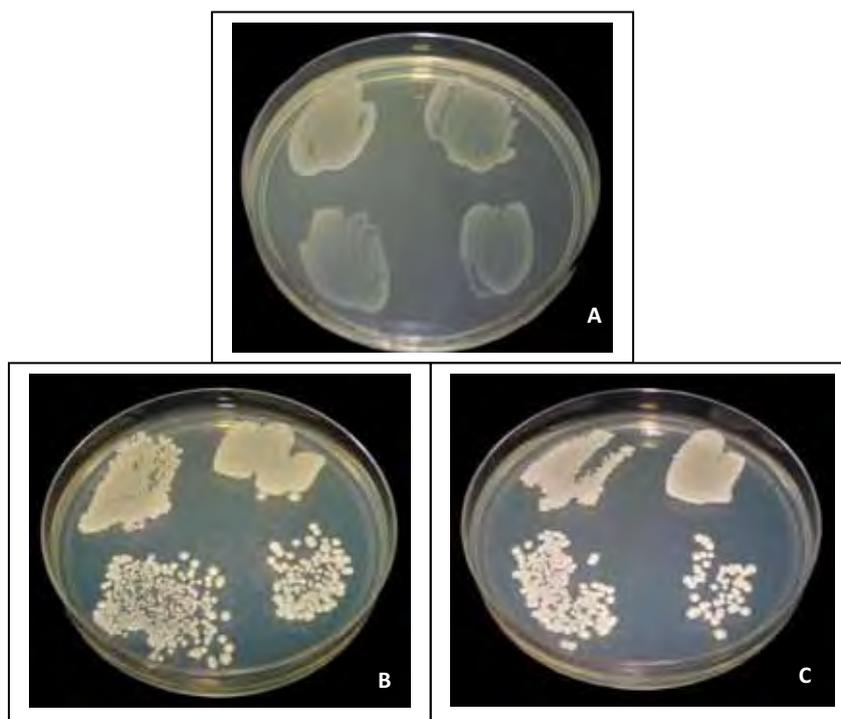
Com relação à variável para o ensaio do XTT, embora a interação entre os fatores tenha sido altamente significativa ( $p=0,007$ ), verificou-se que o tipo do tratamento teve maior efeito na variabilidade dos resultados do que as diferentes cepas (Tabela A10). A comparação múltipla entre médias esteve de acordo com esse resultado, tendo em vista que para todas as cepas houve diferença significativa entre os valores médios de XTT observados nos grupos FS+L+ e FS-L-, enquanto que a redução do metabolismo promovido pela PDT foi similar entre as cepas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios e desvios-padrão de  $\log(\text{ufc/mL})$  e do ensaio do XTT para espécie *C. glabrata* de acordo com o tratamento aplicado (CUR/CTAB).

Variável	Cepa	Tratamento					
		FS+L+		FS+L-		FS-L-	
$\log(\text{ufc/mL})$	ATCC	4,17	<sup>aA</sup> ± 0,05	6,33	<sup>aB</sup> ± 0,03	6,40	<sup>aC</sup> ± 0,02
	63R	4,42	<sup>bA</sup> ± 0,04	6,31	<sup>abB</sup> ± 0,06	6,32	<sup>bB</sup> ± 0,07
	50R	3,57	<sup>cA</sup> ± 0,05	6,25	<sup>bB</sup> ± 0,01	6,24	<sup>cB</sup> ± 0,02
XTT	ATCC	0,00	<sup>aA</sup> ± 0,01	0,18	<sup>aB</sup> ± 0,01	0,20	<sup>aB</sup> ± 0,02
	63R	0,00	<sup>aA</sup> ± 0,00	0,18	<sup>aB</sup> ± 0,02	0,19	<sup>aB</sup> ± 0,04
	50R	0,00	<sup>aA</sup> ± 0,00	0,20	<sup>aB</sup> ± 0,02	0,23	<sup>bC</sup> ± 0,02

<sup>a,A</sup> Letras maiúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma linha. Letras minúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma coluna, na mesma variável.





**Figura 12.** Imagens da cultura de *C. glabrata* 50R após condições experimentais: A, FS+L+ 40 $\mu$ M de concentração de curcumina em micelas de CTAB 0,1mM; B, FS+L- 40 $\mu$ M de concentração de curcumina em micelas de CTAB; C, FS-L-.

#### **4.5. Efeito da PDT mediada pela CUR/SAL sobre as cepas de *C. glabrata***

Os valores originais de ufc/mL e do XTT obtidos após a PDT com a curcumina em solução CUR/SAL estão apresentados nas Tabelas A5 e A6 do apêndice deste trabalho.

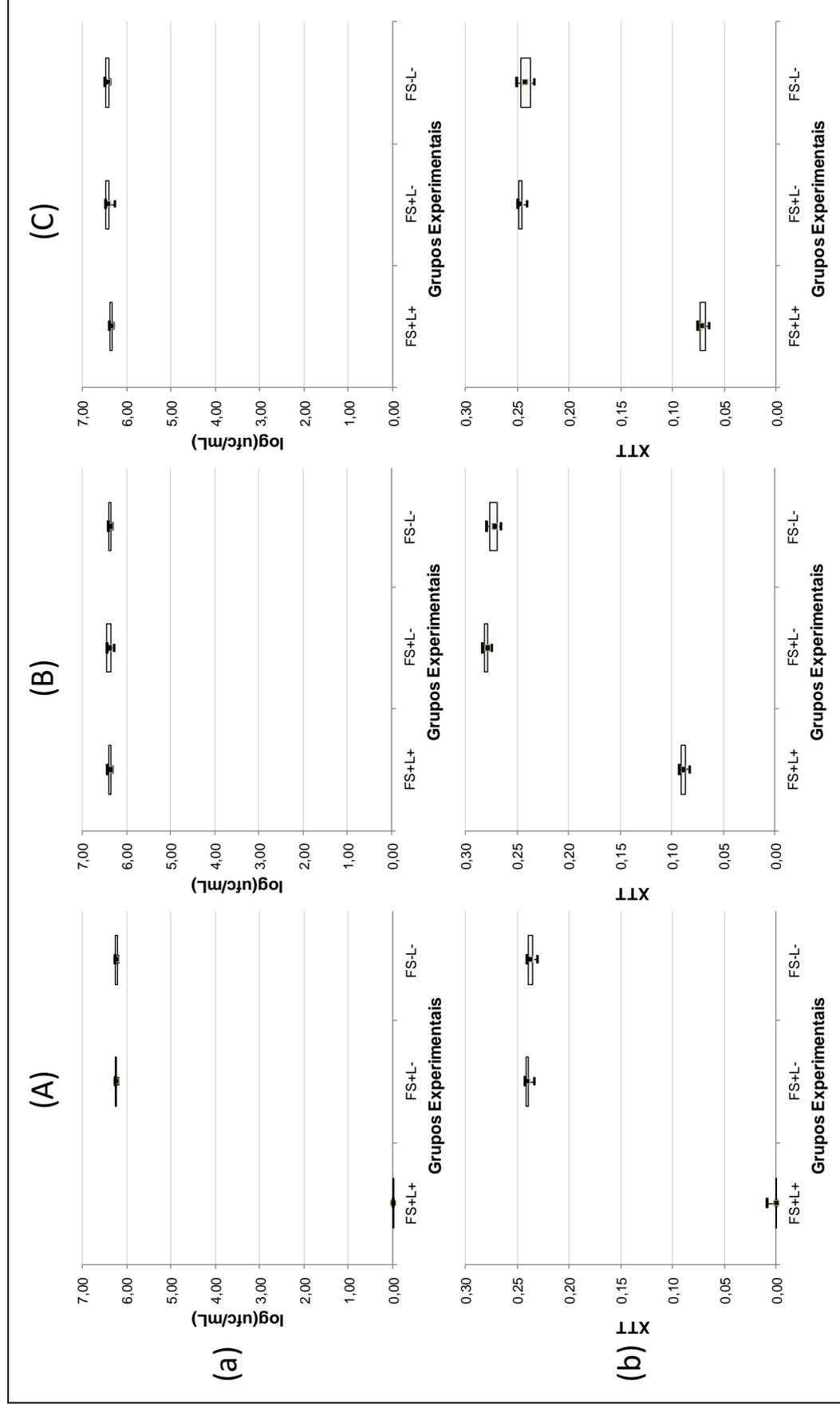
A Figura 13 apresenta os resultados para as variáveis  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  e XTT. A utilização da CUR/SAL como fotossensibilizador promoveu a completa inativação da cepa Cg ATCC, tendo em vista os valores nulos de  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  e XTT que foram observados somente para esse micro-organismo na condição FS+L+.

Com relação à viabilidade celular quantificada por meio do  $\log(\text{ufc/mL})$ , a cepa Cg ATCC sofreu redução significativa após a aplicação da PDT (Tabela 4), enquanto que a utilização do fotossensibilizador sem luz não foi capaz de diminuir a viabilidade fúngica. Para as demais cepas (Cg 63R e 50R), a variação no tipo de tratamento aplicado resultou em valores médios de  $\log(\text{ufc/mL})$  estatisticamente similares (Tabela 4). Apesar disso, em todas as cepas os valores médios de XTT dos grupos FS+L+ foram estatisticamente diferentes daqueles observados nos grupos FS-L-, indicando que o metabolismo fúngico foi reduzido com a exposição das células à PDT, independentemente da cepa avaliada.

**Tabela 4.** Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) e do ensaio do XTT para espécie *C. glabrata* de acordo com o tratamento aplicado (Curcumina em DMSO).

Variável	Cepa	Tratamento											
		FS+L+			FS+L-			FS-L-					
log(ufc/mL)	ATCC	0,00	<sup>aA</sup>	±	0,00	6,24	<sup>aB</sup>	±	0,02	6,24	<sup>aB</sup>	±	0,03
	63R	6,38	<sup>bA</sup>	±	0,04	6,39	<sup>bA</sup>	±	0,05	6,38	<sup>bA</sup>	±	0,03
	50R	6,36	<sup>bA</sup>	±	0,03	6,42	<sup>bA</sup>	±	0,07	6,44	<sup>cA</sup>	±	0,04
XTT	ATCC	0,00	<sup>aA</sup>	±	0,00	0,24	<sup>aB</sup>	±	0,00	0,24	<sup>aB</sup>	±	0,00
	63R	0,09	<sup>bA</sup>	±	0,00	0,28	<sup>bB</sup>	±	0,00	0,27	<sup>bC</sup>	±	0,00
	50R	0,07	<sup>cA</sup>	±	0,00	0,25	<sup>cB</sup>	±	0,00	0,24	<sup>cC</sup>	±	0,01

<sup>a,A</sup> Letras maiúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma linha. Letras minúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma coluna, na mesma variável.



**Figura 13.** Diagramas de caixas contendo os valores para  $\log(\text{ufc/mL})$  e da absorbância do ensaio do XTT para a espécie *C. glabrata* após aplicação da PDT com curcumina 40 $\mu\text{M}$  em solução salina 0,85% e DMSO 10%: A, *C. glabrata* ATCC; B, *C. glabrata* 63R; C, *C. glabrata* 50R.

#### **4.6. Efeito da PDT mediada pela Curcumina em CTAB sobre a capacidade de adesão e formação de biofilme das cepas de *Candida***

Os valores originais de ufc/mL obtidos para avaliação da capacidade de adesão e formação de biofilme das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* estão apresentados nas Tabelas A13 e A14 do apêndice deste trabalho.

A exposição prévia à PDT utilizando-se CUR/CTAB reduziu significativamente o número de células aderidas de *C. albicans* e também o número de células nos biofilmes das três cepas avaliadas (Tabela 5). No grupo FS-L-, as cepas resistentes ao fluconazol apresentaram maior capacidade de adesão e formação de biofilme em comparação com a cepa ATCC. No entanto, após a exposição à PDT (grupo FS+L+) as cepas resistentes apresentaram valores de log(ufc/mL) inferiores aos observados para a cepa de referência.

A avaliação das três cepas da espécie *C. glabrata* foi observada redução significativa no número de células aderidas e também o número de células viáveis nos biofilmes de 48 horas (Tabela 5). No entanto, a cepa 50R foi a que sofreu a maior influência da PDT em sua capacidade de adesão e formação de biofilme.

**Tabela 5.** Valores médios e desvios-padrão de log(ufc/mL) para espécie *C. albicans* e *C. glabrata* após a PDT de acordo com o tratamento aplicado (Curcumina em CTAB).

Espécie	Avaliação	Cepa	Tratamento	
			FS+L+	FS-L-
<i>C. albicans</i>	Adesão	ATCC	5,37 <sup>aA</sup> ± 0,03	5,83 <sup>aB</sup> ± 0,54
		15R	2,58 <sup>bA</sup> ± 0,05	6,38 <sup>bB</sup> ± 0,02
		10R	2,57 <sup>bA</sup> ± 0,06	6,38 <sup>bB</sup> ± 0,02
	Biofilme	ATCC	5,37 <sup>aA</sup> ± 0,02	6,51 <sup>aB</sup> ± 0,01
		15R	2,74 <sup>bA</sup> ± 0,12	6,33 <sup>bB</sup> ± 0,02
		10R	2,77 <sup>bA</sup> ± 0,10	6,40 <sup>bB</sup> ± 0,01
<i>C. glabrata</i>	Adesão	ATCC	5,22 <sup>aA</sup> ± 0,10	5,59 <sup>aB</sup> ± 0,01
		63R	5,30 <sup>aA</sup> ± 0,01	6,41 <sup>bB</sup> ± 0,02
		50R	2,33 <sup>bA</sup> ± 0,12	6,37 <sup>bB</sup> ± 0,03
	Biofilme	ATCC	6,30 <sup>aA</sup> ± 0,03	6,57 <sup>aB</sup> ± 0,01
		63R	5,35 <sup>bA</sup> ± 0,05	6,35 <sup>bB</sup> ± 0,02
		50R	3,01 <sup>cA</sup> ± 0,03	6,39 <sup>bB</sup> ± 0,01

<sup>a,A</sup> Letras maiúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma linha. Letras minúsculas iguais não denotam diferença estatisticamente significativa entre os valores na mesma coluna, dentro da mesma avaliação.

## 5. Discussão

A Terapia Fotodinâmica tem sido empregada para inativação de micro-organismos patogênicos (CARTLEDGE, *et. al.*, 1999; DAHL, *et. al.*, 1989; DEMIDOVA & HAMBLIN, 2005; DOVIGO, *et. al.*, 2009, DOVIGO, *et. al.*, 2010, DOVIGO, *et. al.*, 2011a; JACKSON, *et. al.*, 1999; WAINWRIGHT, *et. al.*, 1998; ZEINA, *et. al.* 2001) estando o primeiro relato de investigações *in vitro* do efeito fotodinâmico datado de 1900 (KONOPKA & GOSLINSKI, *et. al.* 2007). A disseminação da AIDS e o surgimento de cepas resistentes a medicamentos despertaram novamente o interesse pela PDT (JORI, *et. al.*, 2006; KONOPKA & GOSLINSKI, *et. al.* 2007). Esse interesse advém de certas vantagens, como a simplicidade no mecanismo de ação, que resulta da interação entre um agente fotossensibilizante e luz visível em um comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do FS (BUYTAERT, *et. al.*, 2007; KONOPKA & GOSLINSKI, *et. al.* 2007) e do fato da PDT apresentar baixo potencial mutagênico, tornando improvável o surgimento de cepas resistentes. (BUYTAERT, *et. al.*, 2007, JORI, *et. al.*, 2006).

Esse trabalho avaliou o efeito fotodinâmico mediado pela ação fotossensibilizadora da curcumina, sobre cepas de referência (ATCC) e isolados clínicos com resistência a fluconazol das espécies *C. albicans* e *C. glabrata*, em meio homogêneo constituído de CUR/SAL e em meio microheterogêneo (micelar ou pseudo-fase) constituído de CUR/CTAB.

Com este estudo, foi observado que o uso do CUR/SAL nas condições avaliadas na PDT não foi capaz de inviabilizar completamente as cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol, o que não ocorreu com as cepas sensíveis, onde foi observada a sua completa inativação. No entanto, quando foi utilizada a CUR/CTAB, verificou-se um efeito antifúngico mais pronunciado sobre as cepas resistentes a fluconazol, tanto para *C. glabrata* como para *C. albicans*.

A atividade antimicrobiana do surfactante é uma consequência direta das suas propriedades físico-químicas, em especial a capacidade de redução da tensão superficial e a formação de agregados iônicos. Consequentemente, os surfactantes podem interagir com as membranas celulares, conduzindo a perdas do potencial de membrana, alteração da sua funcionalidade e até mesmo perda de constituintes celulares (ISHIKAWA *et al.*, 2002; SAKAGAMI *et al.*, 1989; TABATA *et al.*, 2003; TATTAWASART *et al.*, 2000). Como resultado destas alterações, pode ocorrer alterações como inibição metabólica das células, com perturbação do seu crescimento e lise celular (Kanazawa *et al*, 1995). De acordo com vários autores (GILBERT *et al.*, 2003; ISHIKAWA *et al.*, 2002; SAKAGAMI *et al.*, 1989; STEWART, *et al.*, 2001; TABATA *et al*, 2003), os surfactantes podem danificar a estrutura da membrana pela interação com seus componentes, em particular os lipídios e as proteínas,

podendo ocorrer até a extração de proteínas da membrana celular. Para o CTAB, a porção hidrofóbica penetra nas membranas e o seu grupo polar catiônico associa-se com os grupos fosfatos dos fosfolípidos, provocando alterações nas membranas, que se reflete na alteração da sua permeabilidade seletiva e perda de componentes intracelulares. Assim, o surfactante pode também entrar no meio intracelular e exercer um efeito desnaturante para proteínas.

A influência de derivados azólicos sobre a virulência de *C. albicans* tem sido investigada (GOW *et al.* 2002, BENHARDT *et al.* 2003). Willis *et al.* (2001) relataram a diminuição da habilidade de adesão às células epiteliais bucais e decréscimo na produção de fosfolipase de *C. albicans* tratadas com fluconazol. Em concentrações subinibitórias de itraconazol, Blanco *et al.* (2006) verificaram redução da adesão às células epiteliais desta levedura. Há indicações de que micro-organismos susceptíveis perdem a habilidade de formar hifas sob a ação do antifúngico, enquanto os isolados resistentes não são ou são pouco afetados sob estas condições (COSTA, *et al.*, 2011; HA & WHITE 1999), além disso, nestes trabalhos, a formação de hifas foi inibida significativamente nos isolados susceptíveis, tanto na presença de itraconazol quanto de fluconazol. Estes resultados mostram que a ação desses antifúngicos nos isolados susceptíveis é concomitante a inibição da formação de hifa. Assim pode ser sugerido que nos isolados resistentes, a formação de hifa seja um importante fator de resistência, não inibindo o crescimento do fungo sob a ação desses antifúngicos.

Os azólicos atuam na produção de ergosterol, conhecido como o principal constituinte da membrana celular; seu efeito sobre a formação hifal ocorre provavelmente devido ao aumento da área de superfície das células hifais comparada à das leveduras, pois estruturas hifais requerem mais membrana plasmática por célula (COSTA, *et al.*, 2011). Trabalhos anteriores mostram que uma amostra com alterações no gene ERG11, responsável pela produção do ergosterol, apresenta limitações na produção hifal, presumivelmente devido à carência de ergosterol (LEES *et al.* 1990).

Como a PDT atua na oxidação do ergosterol, levando à formação de oxisteróis, e como as células hifais possuem uma concentração maior desse lipídeo e o fato da área de superfície nessa forma celular ser maior, os resultados encontrados neste trabalho corroboram com a literatura, visto que a ação da PDT utilizando o surfactante CTAB foi mais eficiente em células resistentes. A utilização de um surfactante pode levar a um aumento na permeabilidade da membrana e danos a esta estrutura, onde a penetração do FS pode ser facilitada, fazendo com que a PDT seja mais eficaz. Assim, a formação de fotoprodutos da curcumina e/ou espécies reativas de oxigênio também podem atuar de forma mais eficaz, tendo em vista que essa espécie eletronicamente excitada de oxigênio é altamente reativa para os constituintes celulares

e pode promover a oxidação irreversível dos componentes por meio de lise da membrana e inativação de proteínas (HENDERSON & DOUGHERTY, *et. al.*, 1992). Além disso, foi observada uma alteração na morfologia das cepas resistentes, no grupo PDT (FS+L+) onde pôde ser vistas o crescimento de células opacas e sem um contorno arredondado, característico de espécies de *Candida* e de tamanho reduzido, quando comparado com o grupo controle (FS-L-).

No ensaio de fatores de virulência, como a capacidade das espécies em aderir e formar biofilme em superfície abiótica foi observado que a exposição prévia à PDT com CUR/CTAB reduziu significativamente o número de células aderidas bem como o número de células nos biofilmes das cepas avaliadas. No entanto, as cepas resistentes apresentaram menor número de células aderidas do que as cepas sensíveis.

A adesão de micro-organismos às superfícies mucosas do hospedeiro é um pré-requisito para a ocorrência de processos de infecção e colonização. Tal mecanismo permite que o micro-organismo evite o seu deslocamento pela ação mecânica da musculatura e dos fluídos corporais (ELLEPOLA *et al*, 1998; SUNDSTROM, 1999). A aderência do fungo à superfície da mucosa do hospedeiro ocorre provavelmente pela interação entre adesinas do micro-organismo e receptores das células epiteliais (ARGIMÓN *et al*, 2007). A produção de enzimas representa um mecanismo de virulência de leveduras do gênero *Candida*, pois estas facilitam o poder invasivo do micro-organismo (ODDS, 1988; CALDERONE & FONZI, 2001). Lyon & Resende (2007) demonstraram a produção de proteinases por *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* e a produção de fosfolipases por *C. glabrata*. As proteinases constituem uma família de enzimas capazes de degradar vários substratos fisiologicamente importantes como albuminas e imunoglobulinas (CASSONE *et al.* 1987). A capacidade de *C. albicans* de produzir fosfolipases também é considerada uma importante característica patogênica deste micro-organismo (SAMARANAYAKE *et al.* 1984).

Em estudo desenvolvido por Costa, *et. al*, 2011 foi verificado que surfactantes catiônicos, como o CTAB, podem ser uma alternativa interessante como agente inibitório contra espécies de *Candida*. Este fato está provavelmente associado com a presença de sua carga catiônica, o que pode ser decisivo para o mecanismo de sua interação com o fungo. Nesse caso, compostos neutros ou aniônicos, como determinados FSs, podem ter uma interação mais efetiva na interação com diversos micro-organismos quando administrado concomitantemente com agentes catiônicos. A ação de surfactantes pode também constituir-se de um efetivo mecanismo de desnaturação, mesmo em concentrações milimolares (PERLES, *et. al.*, 2008).

A desnaturação de adesinas por surfactantes pode ser considerada o principal fator que inibe as propriedades de adesão em células de levedura (COSTA, *et. al.*, 2011), entretanto outros fatores coadjuvantes podem contribuir para a ação antiaderente dos surfactantes. Na verdade, o mecanismo dessa propriedade antiaderente parece ser também associado a rupturas na membrana dos fungos e uma interferência estérica na abordagem entre as células microbianas e as células epiteliais, no entanto, outros fatores, incluindo a alteração da hidrofobicidade da superfície celular e potencial zeta das células, podem também contribuir para este fenômeno (MACCARRON, *et. al.*, 2007). De qualquer forma, a relevância da interferência estérica na abordagem entre fungo e o substrato pode ser considerado um fator importante na inibição de aderência, uma vez que os agentes tensoativos apresentam uma cadeia hidrofóbica longa que certamente significativamente diminui o contato entre a célula microbiana e o substrato (COSTA, *et. al.*, 2011).

Também foi verificado neste estudo que a diminuição do metabolismo celular das cepas avaliadas não foi acompanhada da diminuição da contagem de células viáveis.

Ensaio de susceptibilidade antifúngica é a principal ferramenta para orientar possíveis tipos de terapia (REX *et al*, 2001;. PATTERSON, 2002; HOSPENTHAL *et al*, 2004;. PFALLER, 2005). Ensaio metabólico que dependem de redução de um corante sensível ao estado redox da célula (XTT ou alamarBlue) têm sido amplamente aceitos para os testes de susceptibilidade antifúngica (TELLIER *et al*, 1992;. PFALLER *et al*, 1994;. HAWSER *et al*, 1998;. MELETIADIS *et al*, 2001;. YAMAGUCHI *et al*, 2002;. ESPINEL-INGROFF, 2006): podem ser adaptados para os ensaios *in situ*, que captura o estado patogênico do organismo (RAMAGE *et al*, 2001;. PETTIT *et al*, 2005; ANTACHOPOULOS *et al.*, 2006) e, além disso, os ensaios metabólicos são os preferidos para sistemas em que a avaliação com base em unidades formadoras de colônia (ufc/mL) é impraticável ou impossível (BAILLIE e DOUGLAS, 1999; CUENCA-ESTRELLA & RODRIGUEZ-TUDELA, 2001; RAMAGE *et al*, 2001; VAN VIANEN *et al*, 2006). Este é especialmente o caso de testes de susceptibilidade de micélio fúngico e biofilmes que incorporam formas filamentosas (LATGE, 1999; RAMAGE *et al*, 2001; LEWIS *et al*, 2005).

Em estudo desenvolvido por Khot, *et. al.*, 2008, onde foi avaliado o ensaio do XTT versus o número de unidades formadoras de colônia (ufc/mL) após tratamento com Anfotericina B, os autores verificaram que a diferença das estimativas das células viáveis com base em ufc/mL versus o ensaio metabólico do XTT se origina de uma perturbação na velocidade de crescimento das células danificadas pela exposição à anfotericina B, mas, no entanto, ainda são capazes de formarem colônias. As células expostas a anfotericina B e que

ainda eram capazes de formar colônias, apresentaram uma grande variedade de tamanhos, enquanto que as células não tratadas produziram colônias com uma distribuição de tamanho relativamente semelhante. Na maioria das avaliações baseadas em ensaios de metabolismo, as células com taxas metabólicas e/ou crescimento mais lento contribuem proporcionalmente menos para uma estimativa global da viabilidade. Em contraste, as células produtoras de colônias contribuem igualmente para a estimativa de viabilidade baseados nas células viáveis (ufc/mL) independentemente do tamanho da colônia. Assim, parece plausível ser pobre a correspondência relativa entre os ensaios metabólicos e de viabilidade celular (ufc) para as células em fase estacionária, em comparação com células na fase exponencial, o que poderia ter se originado a partir da recuperação relativamente lenta de células em fase estacionária após a exposição à anfotericina B.

## 6. Conclusão

Com estes estudos, pudemos verificar que a utilização concomitante da curcumina com o surfactante CTAB e a exposição à luz na inativação microbiana, reduziu significativamente a atividade metabólica de cepas de espécies de *C. albicans* e *C. glabrata* susceptíveis e resistentes ao fluconazol, bem como, a quantidade de células viáveis. Entretanto, para as cepas padrão (ATCC) de ambas as espécies, a utilização da curcumina na ausência de micelas de CTAB foi mais eficaz, levando a uma redução de 100% nos ensaios avaliados após a PDT.

Para a verificação de fatores de virulência nas cepas testadas, pudemos observar que a utilização do CTAB diminuiu a capacidade das células em aderir e formar biofilme em superfície abiótica, sendo estes efeitos mais eficazes para as cepas resistentes do que para as cepas padrão.

Esses resultados exploram as perspectivas para a utilização da Terapia Fotodinâmica com fotossensibilizadores em diferentes meios (matrizes), como a ausência e a presença de surfactantes (em concentrações micelares), com efeitos promissores para inativação de espécies de fungos com diferentes perfis de resistência ao fluconazol.

# *7. Referências*

## *Bibliográficas*

- ❖ Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. **Clin Dermatol.** 2006; 24: 16-25.
- ❖ Álvares, C. A; SVIDZINSKI, T. I. E; CONSOLARO, M E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319-327, out. 2007.
- ❖ Amato, A., A.L. Costa & A. Misefari, 1968. Attivita micostatica in vivo di um sale quaquaternario d'ammonio. **ATTI Soc. Peloritana Sci Fis. Mat. Natur.** 14 (1/2): 109-116.
- ❖ Ammom, H. P., Safayhi, H.; Mack, T.; Sabieraj, J. Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumin and boswellic acids. **J Ethnopharmacol**, 1993. 38; 113-9.
- ❖ Andrade, M. C., Efetividade da terapia fotodinâmica mediada pela curcumina em *Candida spp.*. Efeito do tempo de pré-irradiação. (Dissertação). Araraquara (SP): Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2011.
- ❖ Araújo CAC, Leon LL 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96: 723-728.
- ❖ Argimón, S.; Wishart J.A.; Leng, R.; Macaskill, S.; Mayor, A.; Alexandris, T.; Nicholls S, Knight AW, Enjalbert B, Walmsley, R.; Odds, F.C.; Gow, N.A.R.; Brown, A.J.P. Developmental Regulation of na Adhesin Gene during Cellular Morphogenesis in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Eukaryot Cell.** V.6, n.4, p.682-692, 2007.
- ❖ Armstrong, W. McD., 1957. Surface active agents and cellular metabolism. I. The effect of cationic detergents on baker's yeast. **Arch. Biochem. Biophys.** 71:137.
- ❖ Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, Yun I, Bae SK, Kim KW. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. **Oncol Rep.** 2006 Jun;15(6):1557-62.

- ❖ Bagnato, VS. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. **Editora Livraria da Física**, SP. 2008.
  
- ❖ Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1999. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. **Methods Enzymol.** 310, 644–656.
  
- ❖ Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist.** 2001; 21: 4-8.
  
- ❖ Belalia R., S. Grelier, M. Benaissa, V. Coma, New bioactive biomaterials based on quaternized chitosan, **J. Agric. Food Chem.** 56 (2008) 1582–1588.
  
- ❖ Benhardt H, Knoke M, Bernhardt J 2003. Changes in *Candida albicans* colonization and morphology under influence of voriconazole. **Mycoses** 46: 370-374.
  
- ❖ Bevilacqua I. M, Nicolau RA, Khouri M, Brugnera A, Teodoro GR, Zângaro RA et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photomed Laser Surg.** 2007; 25(6); 513-518
  
- ❖ Binks, B.P, P.D. Fletcher, I.E. Salama, D.I. Horsup, J.A. Moore, Quantitative prediction of the reduction of corrosion inhibitor effectiveness due to parasitic adsorption onto a competitor surface, **Langmuir** 27 (2011) 469–473.
  
- ❖ Boethling R.S., Environmental fate and toxicity in wastewater-treatment of quaternary ammonium surfactants, **Water Res.** 18 (1984) 1061–1076.
  
- ❖ Bonnett R., Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy, **Chemical Society Reviews**, 24, 19-33, 1995.
  
- ❖ Booij L.H., L.A. van der Broek, W. Caulfield, B.M. Dommerholt-Caris, J.K. Clark, E.J. van, R. McGuire, A.W. Muir, H.C. Ottenheijm, D.C. Rees, Non-depolarizing

neuromuscular blocking activity of bisquaternary amino di- and tripeptide derivatives, **J. Med. Chem.** **43** (2000) 4822–4833.

- ❖ Blanco MT, Morales JJ, Lúcio L, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Gómez-García AC 2006. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. **Oral Microbiology Immunology** **21**: 69-72
- ❖ Budtz-Jorgensen E, Theilade E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. **Scand J Dent Res.** 1983; **91**: 288-95.
- ❖ Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. **Scand J Dent Res.** 1974; **82**: 151-90.
- ❖ Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photossensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.** 1995; **29**(3): 1992-1997.
- ❖ Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J Dent.** 1994; **22**: 273-8.
- ❖ Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim Biophys Acta** 2007; **1776**: 86-107.
- ❖ Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trend. Microbiol.** V.9, n.7, p.327-335, 2001.
- ❖ Cardoso, BC. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. (Dissertação) Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2004.

- ❖ Cartledge JD, Midgley J, Gazzard BG. Non-*albicans* oral candidosis in HIVpositive patients. **J Antimicrob Chemother.** 1999; 43: 419-22.
- ❖ Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Cedia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **J. Infect. Dis.** V.156, n.5, p.777- 783, 1987.
- ❖ Ceri, H., M. Olson, D. Morck, D. Storey, R. Read, A. Buret and B. Olson (2001). The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Microbial Growth in Biofilms**, Pt B. 337: 377-385.
- ❖ Chaffin W.L, López-Ribot J.L., Casanova M, Gozalbo D. and Martinez J.P. (1998) Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 62 (1): 130-180.
- ❖ Colombo, AL & Guimarães, T. Candidúria uma abordagem clínica e terapêutica. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 40(3) 332-337. 2007.
- ❖ Colomer A., A. Pinazo, M.A. Manresa, M.P. Vinardell, M. Mitjans, M.R. Infante, L. Perez, Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities, **J. Med. Chem.** 54 (2011) 989–1002.
- ❖ Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. **Rev Assoc Med Bras.** 1996; 42: 229-36.
- ❖ Correa, M.P. Açafroeira. *Dicionário de plantas úteis do Brasil.* Rio de Janeiro: **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, v. 1, p. 21-22, 1975.
- ❖ Costa, C.R, Sousa, L.K.H, Ataídes, F.S., Ferri, P.H., Costa, M.P., Fernandes, O.F.L., Silva, M.R.R. Molecular analysis and dimorphism of azole-susceptible and resistant *Candida albicans* isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44(6):740-744, nov-dez, 2011.

- ❖ Cort, W.M. Haemoglobin peroxidation test screens antioxidants. **Food Technology**, Chicago, v. 28, p. 60, 1974.
- ❖ Cross, J. E.; *Surfactant Science*, 8th ed., **Marcel Dekker**: New York, 1997.
- ❖ Cross J., E.J. Singer, Cationic Surfactants, Marcel Dekker Inc., New York, 1994.
- ❖ Costerton, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v.284, n.5418, p.1318-22, 1999.
- ❖ Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. **Microbial biofilms**. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49, 711-45.
- ❖ Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. e Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann. Ver. Microbiol.** 41, 435-464.
- ❖ Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., 2001. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. **Clin. Microbiol. Infect.** 7 (Suppl 2), 46–53.
- ❖ Dahl T. A, Midden WR, Neckers DC. Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria. **Photochem Photobiol** 1988; 48(5): 607-12.
- ❖ Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by natural dye curcumin. **Arch Microbiol.** 1989; 151: 183-5.
- ❖ Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, J. W. Costerton and E. P. Greenberg. “The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm”. **Science**, 1998, 280: 295-298.
- ❖ Demidova, T. N.; Hamblin, M. R.; **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** 2004, 17, 245.

- ❖ Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob Agents Chemother.** 2005; 49: 2329-35.
- ❖ DeSimone NA, Christiansen C, Dore D. Bactericidal effect of 0.95-mW helium-neon and 5-mW indium-gallium-aluminum-phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Phys Ther.** 1999; 79: 839-46.
- ❖ Dmochowskaa, B, Piosikb, J, Woziwodzkab, A, Sikoraa, K, Wiśniewskia, A, Wegrzync, G. Mutagenicity of quaternary ammonium salts containing carbohydrate moieties. **Journal of Hazardous Materials** 193 (2011) 272– 278.
- ❖ Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch Oral Biol.** 1992; 37: 883-7.
- ❖ Dovigo LN. Efetividade da terapia fotodinâmica na inativação de *Candida* spp (Dissertação). Araraquara (SP): Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2007.
- ❖ Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant. *Mycoses.* 2009.
- ❖ Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogem®. **Braz J Microbiol.** 2010; 41: 42-9.
- ❖ Dovigo, L, Pavarina, AC, Ribeiro DG, Brunetti, IL, Costa, CA de S, Jacomassi, DP, Bagnato VS, Kurachi, C. Investigation of Phodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*, **Photochemistry and Photobiology**, 2011a, 87: 895-903.

- ❖ Dovigo, L, Pavarina, AC, Carmelo, JC, Machado, AL, Brunetti, IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in surgery and medicine**, 2011b, 9999: 1-8.
- ❖ Dovigo, LN, Carmello, JC, Costa, CAS, Vergani, CE, Brunetti, IL Bagnato, VS, Pavarina, AC. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, 2012.
- ❖ Dube J., Setterfield G., Kiss G. and Lusena C.V. (1973) Fate of the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae* During Cell Rupture. **Can.J.Microbiol.** 19 285.
- ❖ Ehlers, L. J. and Bouwer, E. J. “RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor”. **Wat Sci Technol**, 1999. 7(8): 163-171.
- ❖ Ellepola AN, SAMARANAYAKE LP. Adhesion of oral *Candida albicans* to human buccal epithelial cells following limited exposure to antifungal agents. **J. Oral Pathol. Med.** V.27, n.7, p.325-332, 1998.
- ❖ Espinel-Ingroff, A., 2006. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing zygomycetes, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. **J. Clin. Microbiol.** 4410, 3616–3622.
- ❖ Ghamrawy EE. Quantitative changes in dental plaque formation related to removable partial dentures. **J Oral Rehabil.** 1976; 3: 115-20.
- ❖ Garcia M.T, E. Campos, J. Sanchez-Leal, I. Ribosa, Effect of the alkyl chain length on the anaerobic biodegradability and toxicity of quaternary ammonium based surfactants, **Chemosphere** 38 (1999) 3473–3483.
- ❖ Garcia M.T., I. Ribosa, T. Guindulain, J. Sanchez-Leal, J. Vives-Rego, Fate and effect of monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. **Environ. Pollut.** 111 (2001) 169–175.

- ❖ Geerts G. A, Stuhlinger ME, Basson NJ. Effect of an antifungal denture liner on the saliva yeast count in patients with denture stomatitis: a pilot study. **J Oral Rehabil.** 2008; 35:664-9.
- ❖ Gilbert, P.; McBain, A. J. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** 16, 189-208, 2003.
- ❖ Ghingo, J. M. “Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development”. **Nature**, 2001. 412: 442-5.
- ❖ Govindarajan, V.S. Turmeric – chemistry, technology and quality. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 12, n.3, p. 199-301, 1980.
- ❖ Gow NAR, Brown AJP, Odds FC 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr Opin Microbiol** 5: 366-371.
- ❖ Ha KC, White TC. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother** 1999; 43:763-768
- ❖ Hamblin, M. R.; Hasan, T.; *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, 3, 436.
- ❖ Hawser, S.P., Norris, H., Jessup, C.J., Ghannoum, M.A., 1998. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. **J Clin Microbiol.** 365, 1450–1452.
- ❖ Hausner, M; Wertz, S (1999) High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. **Applied and Environmental Microbiology** 65:3710-3717.

- ❖ Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol.** 1992; 55:145-57.
- ❖ Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW: Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol** 2001, 67(7):2982-92.
- ❖ Hospenthal, D.R., Murray, C.K., Rinaldi, M.G., 2004. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 483, 153–160.
- ❖ Howe, L., Zhang J., The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state, Dynamics of Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate in solution. **Photochemistry and Photobiology**, 1998, 67 (1): 90-96.
- ❖ Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1998; 85: 558-64.
- ❖ Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. **J Am Dent Assoc.** 1992; 123: 46-51.
- ❖ Ishikawa, M. Y., Katoh-Kubo K., Tsuchido, T. Antibacterial activity of surfactants against *Escherichia coli* cell is influenced by carbon source and anaerobiosis. **Journal of Applied Microbiology.** 93, 302-309 (2002).
- ❖ Ishikawa, S.; Matsumura, Y; Yoshizako, F.; Tsuchido, T. Characterization of a cationic surfactant-resistant mutant isolated spontaneously from *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology.** 92, 261-268 (2002).
- ❖ Israelachvili, J. N. Intermolecular and Surface Forces, 2nd ed.; **Academic Press**: New York, 1991.

- ❖ Jabra-Rizk MA, Shirtliff M, James C, Meiller T: Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. **FEMS Yeast Res** 2006, 6(7):1063-73.
- ❖ Jackson Z, Meghji S, MacRobert A, Henderson B, Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. **Lasers Med Sci.** 1999; 14: 150-7.
- ❖ Jönsson, B. Lindman, K. Holmberg, B. Kronberg Surfactants and polymers in aqueous solutions. **Wiley and Sons**, New York (1998)
- ❖ Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. **J Antimicrob Chemother** 1995; 35: 103–14.
- ❖ Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers Surg Med.** 2006; 38: 468-81.
- ❖ Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Polon** 2009; 55 : 211 – 224.
- ❖ Kanazawa, A.; Ikeda, T. e Endo, T. (1995) A novel approach to mode of action of cationic biocides: morphological effect on antibacterial activity. **Journal of Applied Bacteriology.** 78, 309-313
- ❖ Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Curr Opin Microbiol.** 2005; 8: 378-84.
- ❖ Khot, PD, Suci, PA, Tyler, BJ. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: Assessment using metabolic assays and colony forming units. **Journal of Microbiological Methods** 72 (2008) 268–274

- ❖ Koehn FE, Carter GT 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** 3: 206-220.
- ❖ Koks CH, Meenhorst PL, Bult A, Beijnen JH. Itraconazole solution: summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in HIV-infected persons. **Pharmacol Res** 2002; 46: 195–201.
- ❖ Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev** 2002; 66: 486–505.
- ❖ Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res.** 2007; 86: 694-707.
- ❖ Kongsberg R, Axell T. Treatment of *Candida*-infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1994; 78: 306-11.
- ❖ Koon HK, Leung AWN, Yue KKM, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** 2006; 25: 205-15.
- ❖ Kutscher, A. H., L. Seguin, S. Lewis, J. D. Piro & E. V. Zegarelli,. 1954. Growth inhibitory properties of phenoxyethyl dimethyldodecylammonium bromide (PDDDB) (Bradosol) against *Candida albicans* in vitro-preliminary report. **Antibiot and Chemother.** 4 (10): 1045-1049.
- ❖ Kutscher, A. H., L. Seguin, S. Lewis, J. D. Piro & E. V. Zegarelli,. 1956. Fungicidal properties of phenoxyethyl dimethyldodecylammonium bromide (PDDDB) (Bradosol) against *Candida albicans* in vitro II. **Antibiot and Chemother** 6: 400-403.
- ❖ Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. **FEMS Microbiol Lett.** 2005; 242: 345-51.

- ❖ Lees ND, Broughton MC, Sanglard D, Bard M 1990. Azole susceptibility and hyphal formation in cytochrome P-450-deficient mutant of *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother** 34: 831-836.
  
- ❖ Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, *et al* . Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter prospective, observational study in France (2005 – 2006). **Crit Care Med** 2009; 37: 1612 – 1618.
  
- ❖ Levinson M.I., Rinse-added fabric softener technology at the close of the twentieth century, **J. Surfactants Deterg.** 2 (1999) 223–235.
  
- ❖ Lichtenberg, D., V. Zilberman, P. Greenzaid & S. Zamir, 1979. Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. **Biochemistry** 18: 3517-3525.
  
- ❖ Lyon JP, Resende MA. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. **Mycoses.** V.50, n.1, p.21-24, 2007.
  
- ❖ McCarron PA, Donnelly RF, Marouf W, Calvert DE. Antiadherent and antifungal activities of surfactant-coated poly (ethylcyanoacrylate) nanoparticles. **Int J Pharmacol.** 2007; 340:182–90.
  
- ❖ MacFarlane TW, Samaranayake LP. **Clinical Oral Microbiology.** London, UK: Wright, 1989.
  
- ❖ Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím Nova.** 2000; 32: 237-43.
  
- ❖ Mah TF, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol** 2001; 9, 34-9.

- ❖ Malmsten, M. Surfactants and Polymers in Drug Delivery. Marcel Dekker, **Inc: New York**, 2002.
- ❖ Mandy H. M. Leung, Hannah Colangelo, and Tak W. Kee. Encapsulation of Curcumin in Cationic Micelles Suppresses Alkaline Hydrolysis. **Langmuir** 2008, 24, 5672-5675.
- ❖ Martins CVB, Silva DL, Neres ATM, Magalhaes TFF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother.** 2009; 63: 337-9.
- ❖ Martins, M.C.; RUSIG, O. Cúrcuma – um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 53-65, 1992.
- ❖ Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Curr Drug Targets** 2005; **6**: 863 – 874.
- ❖ Mazumder A, Raghavan K, Weinstein J, Kohn KW, Pommier Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochem Pharmacol.** 1995 Apr 18; 49(8):1165-70.
- ❖ McDonnell G., A.D. Russell, Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance, **Clin. Microbiol. Rev.** 12 (1999) 147–179.
- ❖ Mehta, K., Pantazis, P., McQueen, T., Agarwal, B.B. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. **Anti-cancer Drugs**, Oxford, v.8, n.5, p.470-481, 1997.
- ❖ Meletiadis, J., Mouton, J.W., Meis, J.F., Bouman, B.A., Donnelly, J.P., Verweij, P.E., 2001. Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. **J. Clin. Microbiol.** 399, 3402–3408.

- ❖ Melo, E. B, Bruni, A. T, Ferreira, M. M. C, Inibidores da HIV-integrase: potencial abordagem farmacológica para tratamento da Aids. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 3, 555-562, 2006
- ❖ Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. **Cancer Lett** 1999;141:159-165.
- ❖ Milán, D.R. Cúrcuma, produção e utilização como ingrediente e aditivo na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 248-249, 1992.
- ❖ Mima, E.G. de O., Pavarina, A.C., Vargas, F. da .S, Giampaolo, E.T., Machado, A.L., Vergani, C.E., Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole-resistant *Candida albicans*: in vitro study, **Mycoses**. Volume 54, Issue 5, pages e506-e512, September, 2011.
- ❖ Nałecz-Jawecki G., E. Grabin´ ska-Sota, P. Narkiewicz, The toxicity of cationic surfactants in four bioassays, **Ecotoxicol. Environ. Safe**. 54 (2003) 87–91.
- ❖ Nikawa H, Jin C, Makihira S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. **J Oral Rehabil**. 2003; 30: 243-50.
- ❖ Navarathna DH, Hornby JM, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel GE, Nickerson KW: Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. **Infect Immun** 2007, 75(4):1609-18.
- ❖ Odds FC. *Candida and Candidosis*. **Second Edition, London: Bailliere Tindall**. 1988.
- ❖ Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg Med**. 1992; 12: 450-8.
- ❖ Olsen I. Denture stomatitis. Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora. **Acta Odontol Scand**. 1975; 33: 41-6.

- ❖ O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54, 49-79.
- ❖ Papahadjopoulos D., Poste G. and Vail W.J. (1979) Studies on Membrane-fusion with Natural and Model Membranes. **Methods Membr. Biol.** 10 1.
- ❖ Patterson, T.F., 2002. Fungal susceptibility testing: where are we now? **Transpl. Infect. Dis.** 4 (Suppl 3), 38–45.
- ❖ Pereira, PHF; Silva, MLCP. Estudo da adsorção desurfactante catiônico na matriz inorgânica fosfato de nióbio hidratado. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 7-11, 2009.
- ❖ Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. **J Prosthet Dent.** 2005; 93: 288-93.
- ❖ Perfect JR, Casadevall A. “Fungal molecular pathogenesis: what can it do and why do we need it?” In: Heitman J (ed.), **Molecular Principles of Fungal Pathogenesis**. Washington, DC: ASM Press, 2006; 3 – 11.
- ❖ Perles CE, Matheus A, Volpe PLO. The effect of quaternary ammonium surfactants on the inhibition of the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*—a calorimetric study. **Termochimica Acta.** 2008; 479:28–31.
- ❖ Perussi, J. R., “Inativação fotodinâmica de micro-organismos”. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 4, 988-994, 2007
- ❖ Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, *et al* . “Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates”. **J Clin Microb** 1998; **36**: 1518 – 1529.

- ❖ Pfaller, M.A., Grant, C., Morthland, V., Rhine-Chalberg, J., 1994. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** 322, 506–509.
- ❖ Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, *et al* . “Caspafungin activity against clinical isolates of fl uconazole-resistant *Candida*”. **J Clin Microbiol** 2003; **41** : 5729 – 5731.
- ❖ Pfaller, M.A., 2005. Antifungal susceptibility testing methods. **Curr. Drug Targets.** 68, 929–943.
- ❖ Priyadarsini KI. “Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells”. **J Photochem Photobiol C: Photochem Reviews.** 2009; 10: 81–95.
- ❖ Raab, O.; *Z. Biol.* 1900, 39, 524.
- ❖ Rabea E.I., M.E. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action, **Biomacromolecules** **4** (2003) 1457–1465.
- ❖ Ramage, G., vande Walle, K., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L., 2001. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** 459, 2475–2479.
- ❖ Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL: Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl Environ Microbiol** 2002, 68 (11): 5459-63.
- ❖ Ramaswamy, T.S., Banerjee, B.N. Vegetable dyes as antioxidant for vegetable oils. **Annals of Biochemistry and Experimental Medicinal**, Calcutá, v. 8, p. 55, 1948.

- ❖ Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., et al., 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.** 144, 643–658.
  
- ❖ Richard, H.; LOO, A. Composition des extraits d' épices et herbes aromatiques. In: Richard, H. (Coord). *Épices & aromates*. Paris: TEC & DOC – **Lavoisier**, 1992. p. 213-238.
  
- ❖ Roberts, A. P., Pratten, M. Wilson and P. Mullany. “Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm”. **FEMS Microbiol Letter**, 1999. 177:636.
  
- ❖ Robertson D. (1981) Membrane Structure. **J.Cell Biol.** 91 1895-1981.
  
- ❖ Rossignol T, Logue ME, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF, Butler G: Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. **Antimicrob Agents Chemother** 2007, 51(7): 2304-12.
  
- ❖ Rusig, O., Martins, M.C. Efeito da temperatura, do pH e da luz sobre extratos de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e curcumina. **Revista Brasileira de Corantes Naturais, Viçosa**, v. 1, n. 1, p. 158-64.1992.
  
- ❖ Sakagami, Y; Yokoyama, H.; Nishimura, H.; Ose, Y.; Tashima, T. Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology.** 55, 2036-2040 (1989)
  
- ❖ Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A.; Steward G. S. A. B.; Williams, P. “Multiple N-acyl-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*”. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1995. 64: 3480-3485.
  
- ❖ Samaranyake LP, Reaside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **J. Med. and Vet. Mycol.** V.22, n.3, p.201-207, 1984.

- ❖ Samaranayake LP, MacFarlane TW. **Oral Candidosis**. London, UK: Wright, 1990.
- ❖ Spikes, J. D. and J. C. Bommer (1986) Zinc phthalocyanine as a photosensitizer for hiornolecules. **Int. J. Radiat. Biol.** **50**, 41- 45.
- ❖ Sarkar B., Y. Xi, M. Megharaj, G.S. Krishnamurti, R. Naidu, Synthesis and characterisation of novel organopalygorskites for removal of p-nitrophenol from aqueous solution: isothermal studies, **J. Colloid Interface Sci.** 350 (2010a) 295–304.
- ❖ Sarkar B., Y. Xi, M. Megharaj, G.S. Krishnamurti, D. Rajarathnam, R. Naidu, Remediation of hexavalent chromium through adsorption by bentonite based Arquad® 2HT-75 organoclays, **J. Hazard. Mater.** 183 (2010b) 87–97.
- ❖ Sarkar B., M. Megharaj, Y. Xi, G.S. Krishnamurti, R. Naidu, Sorption of quaternary ammonium compounds in soils: implications to the soil microbial activities, **J. Hazard. Mater.** 184 (2010c) 448–456.
- ❖ Sarkar B., Y. Xi, M. Megharaj, R. Naidu, Orange II adsorption on palygorskites modified with alkyl trimethylammonium and dialkyl dimethylammonium bromide—an isothermal and kinetic study, **Appl. Clay Sci.** 51 (2011) 370–374.
- ❖ Scartezzini, P.; Speroni, E. Review on some plants of indian traditional medicine with antioxidant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 23-43, 2000.
- ❖ Seelig J., Seelig A. (1980) Lipid Conformation in Model Membranes and BiologicalMembranes. **Q.Rev.Biophys.** 13 19.
- ❖ Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW, Harris SD: Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Mol Microbiol** 2006, 59(3):753-64.
- ❖ Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. **Eur J Cancer.** 2005; 41: 1955-68.

- ❖ Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. **J Oral Pathol Med.** 2005; 34: 340-6.
- ❖ Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilm. **Braz Dent J.** 2008; 19:364-9.
- ❖ Silveira, A. C. B; Oliveira, N. T. de; Neves, R. P; Magalhães, O. M. C; Queiroz, L. A. de. Caracterização fisiológica de culturas não monocelulares e monocelulares de espécies de *Malassezia*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 213-216, jul. 2006.
- ❖ Singer S.J., Nicholson J.N. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membrane. **Science.** 175 720, 1972.
- ❖ Singer S.J. (1974) Molecular Organization of Membranes. **Annu.Rev.Biochem.** 43, 805.
- ❖ Singh, A S, Bhadani, H. Kataria, G. Kaur, R. Kamboj, Synthesis of glycerol-based pyridinium surfactants and appraisal of their properties, **Ind. Eng. Chem. Res.** 48 (2009) 1673–1677.
- ❖ Smith R., Oldfield E. (1984) Dynamic Structures of Membranes by Deuterium *NMR*. **Science.** 225-280.
- ❖ Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers Surg Med.** 1996; 18(3):253-9.
- ❖ Stephenson B. C., Kenneth Beers, and Daniel Blankschtein. Complementary Use of Simulations and Molecular-Thermodynamic Theory to Model Micellization, **Langmuir** 2006, 22, 1500-1513.

- ❖ Stewart P. S.; Rayner, J.; Roe, F.; Rees, W. M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. **Journal of Applied Microbiology**. 91, 525-532
  
- ❖ Sundstrom P. Adhesins in *Candida albicans*. **Curr. Opin. Microbiol.** V.2, n.4, p.353-357, 1999.
  
- ❖ Tabata, A.; Nagamune, H.; Maeda, T.; Murakami, K.; Miyake, Y.; Kourai, H. Correlation between Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Quaternary Ammonium Compounds and Expression of Outer Membrane Protein OprR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 47, 2093-2099 (2003)
  
- ❖ Tamura, Nathalie Kira et al. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 91-93, fev. 2007.
  
- ❖ Tattawasart, U.; Hann, A. C.; Maillard, J. R.; Furr, J. R.; Russell, A. D. Cytological changes in chlorhexidine-resistant isolated of *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**. 45, 145-152, 2000.
  
- ❖ Tellier, R., Krajden, M., Grigoriev, G.A., Campbell, I., 1992. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother.** 368, 1619–1625.
  
- ❖ Theilade, E; Budtz-Jørgensen, E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. **Oral Microbiology and Immunology** Volume 3, Issue 1, pages 8–13, March 1988.
  
- ❖ Thorsteinsson T., M. Masson, K.G. Kristinsson, M.A. Hjalmarsdottir, H. Hilmarsson, T. Loftsson, Soft antimicrobial agents: synthesis and activity of labile environmentally friendly long chain quaternary ammonium compounds, **J. Med. Chem.** 46 (2003) 4173–4181.

- ❖ Tonnesen HH, Vries H, Karlsen J, Van Henegouwen GB. Studies on Curcumin and curcuminoids IX: investigation of photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. **J Pharm Sci.** 1987; 76: 371–3.
- ❖ Tonnesen, H.H & Karlsen, J. 1985. Studies of curcumin and curcuminoids: VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solutions. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** 180: 402-404
- ❖ Trulear, M G and Characklis, W G. Dynamics of Biofilm Processes. Journal (Water Pollution Control Federation), Vol. 54, No. 9, **Annual Conference Issue** (Sep., 1982), pp. 1288-1301
- ❖ Ueno, M., Tese de doutorado: Efeito do brometo de cetiltrimetilamônio no metabolismo e na fisiologia de bactérias e leveduras, 1992.
- ❖ Usacheva M. N, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29(2):165-173.
- ❖ Van Vianen, W., de Marie, S., ten Kate, M.T., Mathot, R.A., Bakker-Woudenberg, I.A., 2006. Caspofungin: antifungal activity in vitro, pharmacokinetics, and effects on fungal load and animal survival in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. **J. Antimicrob. Chemother.** 574, 732–740.
- ❖ Xavier, J. B., C. Picioreanu, J. S. Almeida, M. C. M. van Loosdrecht. Biomatemática – Modelação da estrutura de Biofilmes. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia.**
- ❖ Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother.** 1998; 42: 13-28.
- ❖ Webb B. C., Thomas C. J., Willcox, M. D., Harty, D. W., Knox K. W., Webb B. C., et. al. “Candida-associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. Part

1. Factor influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Aust Dent J.**, 1998; 43: 45-50.
- ❖ White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev** 1998; 11: 382–402.
  - ❖ Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ 2001. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 91: 317-321.
  - ❖ Wilson, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol. B Biol.** v.3, p.412-8, 2004.
  - ❖ Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* in vitro. **Lasers Med Sci.** 1994; 9: 105-9.
  - ❖ Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med.** 1993; 22: 354-7.
  - ❖ Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol.** 1992; 25(2): 77-81.
  - ❖ Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. **Br Dent J.** 1998; 185: 380-4.
  - ❖ Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol.** 1993; 8(3):182-7.
  - ❖ Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel Filho V 2001. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova** 1: 147-152.

- ❖ Yamaguchi, H., Uchida, K., Nagino, K., Matsunaga, T., 2002. Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. **J. Infect. Chemother.** 84, 374–377.
  
- ❖ Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **Br J Dermatol.** 2001; 144: 274-8.
  
- ❖ Zielinski R. (Ed.), Quaternary Ammonium Salts, ITD Press, Poznan, 2005.

## 8. Apêndice

**Tabela A1.** Valores originais de ufc/mL observados após a avaliação do fotossensibilizador CUR/CTAB nas seis cepas de *Candida* avaliadas.

Tratamento	Cepa					
	Ca ATCC	Ca15R	Ca10R	Cg ATCC	Cg 63R	Cg 50R
FS+L+	1,96E+04	3,40E+03	3,20E+03	1,36E+04	3,34E+04	3,60E+03
	1,66E+04	3,80E+03	2,40E+03	1,22E+04	2,72E+04	3,60E+03
	2,20E+04	3,20E+03	2,00E+03	1,32E+04	2,26E+04	3,60E+03
	1,70E+04	3,00E+03	2,60E+03	1,40E+04	2,60E+04	4,00E+03
	1,90E+04	3,80E+03	2,80E+03	1,50E+04	2,60E+04	3,80E+03
	1,74E+04	4,80E+03	3,40E+03	1,74E+04	2,40E+04	4,40E+03
	1,82E+04	4,40E+03	2,60E+03	1,42E+04	2,56E+04	4,40E+03
	1,80E+04	3,60E+03	2,00E+03	1,80E+04	2,78E+04	3,40E+03
	1,78E+04	3,60E+03	2,60E+03	1,60E+04	2,70E+04	3,00E+03
	1,84E+04	3,00E+03	3,00E+03	1,38E+04	2,70E+04	3,40E+03
FS+L-	2,28E+06	1,34E+06	1,66E+06	2,28E+06	2,10E+06	1,70E+06
	2,26E+06	1,24E+06	1,44E+06	2,18E+06	2,38E+06	1,82E+06
	2,48E+06	1,36E+06	1,52E+06	1,82E+06	2,24E+06	1,74E+06
	2,10E+06	1,40E+06	1,54E+06	2,10E+06	2,20E+06	1,82E+06
	2,20E+06	1,44E+06	1,50E+06	2,24E+06	2,38E+06	1,80E+06
	1,72E+06	1,58E+06	1,68E+06	1,86E+06	1,92E+06	1,78E+06
	2,44E+06	1,44E+06	1,76E+06	2,24E+06	1,60E+06	1,84E+06
	2,12E+06	1,50E+06	1,52E+06	2,12E+06	1,88E+06	1,80E+06
	2,18E+06	1,34E+06	1,42E+06	2,18E+06	1,70E+06	1,76E+06
	2,44E+06	1,44E+06	1,40E+06	2,22E+06	2,02E+06	1,88E+06
FS-L-	3,34E+06	1,36E+06	1,54E+06	2,56E+06	2,34E+06	1,76E+06
	2,72E+06	1,44E+06	1,44E+06	2,44E+06	2,68E+06	1,62E+06
	2,26E+06	1,30E+06	1,60E+06	2,34E+06	2,28E+06	1,62E+06
	2,60E+06	1,44E+06	1,50E+06	2,52E+06	2,56E+06	1,82E+06
	2,60E+06	1,40E+06	1,60E+06	2,50E+06	1,78E+06	1,78E+06
	2,40E+06	1,30E+06	1,56E+06	2,46E+06	1,76E+06	1,76E+06
	2,56E+06	1,44E+06	1,70E+06	2,48E+06	2,22E+06	1,82E+06
	2,78E+06	1,52E+06	1,58E+06	2,78E+06	1,86E+06	1,62E+06
	2,70E+06	1,30E+06	1,66E+06	2,70E+06	1,70E+06	1,70E+06
	2,70E+06	1,42E+06	1,52E+06	2,50E+06	1,82E+06	1,82E+06

**Tabela A2.** Valores originais de XTT observados após a avaliação do fotossensibilizador CUR/CTAB nas seis cepas de *Candida* avaliadas.

Tratamento	Cepa					
	Ca ATCC	Ca15R	Ca10R	Cg ATCC	Cg 63R	Cg 50R
FS+L+	0,000	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000
	0,000	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000
	0,000	0,005	0,000	0,010	0,000	0,000
	0,001	0,002	0,000	0,020	0,000	0,000
	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,001	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000
	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
FS+L-	0,179	0,195	0,200	0,197	0,234	0,234
	0,210	0,199	0,210	0,188	0,224	0,224
	0,170	0,176	0,212	0,188	0,198	0,224
	0,189	0,167	0,220	0,187	0,196	0,221
	0,178	0,150	0,170	0,185	0,189	0,204
	0,177	0,158	0,173	0,180	0,186	0,199
	0,180	0,163	0,165	0,179	0,185	0,196
	0,189	0,152	0,169	0,177	0,182	0,190
	0,205	0,169	0,182	0,175	0,178	0,189
	0,198	0,210	0,180	0,173	0,169	0,189
	0,209	0,179	0,188	0,173	0,166	0,187
	0,189	0,182	0,169	0,172	0,165	0,182
	0,179	0,188	0,177	0,169	0,158	0,175
	0,199	0,196	0,189	0,166	0,158	0,170
	0,203	0,170	0,179	0,162	0,152	0,165
FS-L-	0,211	0,203	0,236	0,239	0,152	0,193
	0,185	0,210	0,250	0,233	0,159	0,197
	0,200	0,173	0,240	0,230	0,163	0,205
	0,186	0,163	0,222	0,226	0,163	0,206
	0,191	0,182	0,198	0,205	0,167	0,207
	0,186	0,195	0,171	0,202	0,169	0,218
	0,188	0,197	0,199	0,199	0,172	0,224
	0,193	0,155	0,187	0,196	0,179	0,230
	0,182	0,152	0,189	0,192	0,183	0,235
	0,188	0,201	0,203	0,189	0,206	0,243
	0,192	0,199	0,189	0,182	0,207	0,246
	0,179	0,200	0,192	0,181	0,235	0,250
	0,188	0,183	0,205	0,178	0,246	0,253
	0,195	0,177	0,193	0,176	0,253	0,254
	0,179	0,169	0,195	0,174	0,254	0,263

**Tabela A3.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/CTAB sobre o  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  da espécie *C. albicans*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	3,209	1,604	2	775,272	<0,001	0,950	1,000
Tratamento	124,227	62,114	2	30013,747	<0,001	0,999	1,000
Interação	1,520	0,380	4	183,584	<0,001	0,901	1,000
Resíduo	0,168	0,002	81				
Total	2762,712		90				

**Tabela A4.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/CTAB sobre os valores de XTT da espécie *C. albicans*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	0,001	0,001	2	3,610	0,030	0,054	0,659
Tratamento	1,045	0,522	2	2742,013	<0,001	0,978	1,000
Interação	0,004	0,001	4	4,937	0,001	0,135	0,955
Resíduo	0,024	0,000	126				
Total	3,228		135				

**Tabela A5.** Valores originais de ufc/mL observados após a avaliação do fotossensibilizador CUR/SAL nas seis cepas de *Candida* avaliadas.

Tratamento	Cepa					
	Ca ATCC	Ca15R	Ca10R	Cg ATCC	Cg 63R	Cg 50R
FS+L+	0,00E+00	2,04E+06	2,38E+06	0,00E+00	2,56E+06	2,30E+06
	0,00E+00	2,26E+06	2,38E+06	0,00E+00	2,38E+06	2,52E+06
	0,00E+00	2,62E+06	2,62E+06	0,00E+00	2,12E+06	2,48E+06
	0,00E+00	2,38E+06	3,02E+06	0,00E+00	2,80E+06	2,16E+06
	0,00E+00	2,46E+06	2,28E+06	0,00E+00	2,34E+06	2,02E+06
	0,00E+00	2,28E+06	2,68E+06	0,00E+00	2,34E+06	2,14E+06
	0,00E+00	1,92E+06	2,82E+06	0,00E+00	2,26E+06	2,26E+06
	0,00E+00	1,94E+06	2,54E+06	0,00E+00	2,20E+06	2,32E+06
	0,00E+00	2,44E+06	2,24E+06	0,00E+00	2,70E+06	2,16E+06
	0,00E+00	2,52E+06	2,40E+06	0,00E+00	2,54E+06	2,50E+06
FS+L-	1,60E+06	2,06E+06	2,06E+06	1,62E+06	2,56E+06	2,78E+06
	1,62E+06	1,86E+06	2,36E+06	1,76E+06	2,82E+06	2,68E+06
	1,70E+06	1,56E+06	1,76E+06	1,80E+06	2,70E+06	2,46E+06
	1,62E+06	2,44E+06	1,62E+06	1,78E+06	2,32E+06	2,16E+06
	1,54E+06	2,54E+06	1,96E+06	1,60E+06	2,42E+06	2,54E+06
	1,58E+06	2,26E+06	2,44E+06	1,68E+06	2,84E+06	2,96E+06
	1,66E+06	2,64E+06	2,70E+06	1,82E+06	1,96E+06	1,90E+06
	1,76E+06	2,94E+06	2,38E+06	1,66E+06	2,26E+06	2,88E+06
	1,50E+06	2,70E+06	2,12E+06	1,86E+06	2,78E+06	2,94E+06
	1,76E+06	2,90E+06	1,86E+06	1,78E+06	2,28E+06	3,08E+06
FS-L-	1,46E+06	2,22E+06	2,82E+06	1,86E+06	2,36E+06	2,72E+06
	1,48E+06	2,22E+06	2,54E+06	1,76E+06	2,60E+06	2,56E+06
	1,62E+06	2,82E+06	2,48E+06	1,72E+06	2,12E+06	2,44E+06
	1,44E+06	2,34E+06	3,00E+06	1,88E+06	2,66E+06	2,80E+06
	1,58E+06	2,48E+06	2,44E+06	1,64E+06	2,66E+06	3,20E+06
	1,40E+06	2,30E+06	3,02E+06	1,84E+06	2,38E+06	2,52E+06
	1,66E+06	2,44E+06	2,76E+06	1,88E+06	2,32E+06	2,88E+06
	1,56E+06	2,56E+06	2,54E+06	1,60E+06	2,52E+06	2,62E+06
	1,50E+06	1,86E+06	2,42E+06	1,76E+06	2,20E+06	3,10E+06
	1,62E+06	2,18E+06	2,48E+06	1,64E+06	2,26E+06	2,90E+06

**Tabela A6.** Valores originais de XTT observados após a avaliação do fotossensibilizador CUR/SAL nas seis cepas de *Candida* avaliadas.

Tratamento	Cepa					
	Ca ATCC	Ca15R	Ca10R	Cg ATCC	Cg 63R	Cg 50R
FS+L+	0,000	0,015	0,015	0,000	0,083	0,065
	0,000	0,014	0,016	0,000	0,085	0,066
	0,000	0,014	0,016	0,009	0,085	0,066
	0,000	0,014	0,017	0,000	0,087	0,067
	0,000	0,013	0,017	0,000	0,087	0,069
	0,000	0,013	0,018	0,000	0,088	0,069
	0,000	0,013	0,018	0,005	0,088	0,071
	0,000	0,013	0,018	0,003	0,089	0,072
	0,000	0,013	0,019	0,000	0,09	0,072
	0,000	0,012	0,02	0,000	0,091	0,073
	0,000	0,012	0,02	0,000	0,091	0,073
	0,000	0,012	0,022	0,000	0,091	0,073
	0,000	0,012	0,022	0,000	0,092	0,074
	0,000	0,011	0,022	0,000	0,093	0,075
	0,000	0,011	0,025	0,000	0,093	0,076
FS+L-	0,214	0,223	0,241	0,241	0,284	0,249
	0,211	0,219	0,239	0,242	0,279	0,244
	0,220	0,218	0,244	0,243	0,281	0,250
	0,219	0,224	0,238	0,240	0,283	0,245
	0,212	0,219	0,241	0,239	0,277	0,249
	0,214	0,225	0,244	0,234	0,280	0,244
	0,223	0,231	0,236	0,241	0,281	0,249
	0,221	0,230	0,235	0,239	0,276	0,249
	0,218	0,219	0,236	0,236	0,279	0,241
	0,215	0,226	0,245	0,241	0,283	0,250
	0,213	0,221	0,240	0,241	0,277	0,247
	0,209	0,220	0,238	0,237	0,282	0,246
	0,216	0,218	0,236	0,239	0,279	0,248
	0,217	0,231	0,238	0,243	0,275	0,245
	0,213	0,228	0,238	0,241	0,279	0,248
FS-L-	0,231	0,22	0,229	0,235	0,266	0,234
	0,229	0,229	0,231	0,239	0,269	0,234
	0,225	0,231	0,232	0,240	0,269	0,236
	0,220	0,232	0,233	0,241	0,269	0,237
	0,235	0,233	0,233	0,238	0,269	0,238
	0,235	0,233	0,236	0,237	0,271	0,239
	0,231	0,235	0,236	0,239	0,272	0,241
	0,229	0,235	0,237	0,241	0,272	0,243
	0,218	0,236	0,238	0,231	0,273	0,243
	0,222	0,238	0,239	0,234	0,274	0,245
	0,225	0,239	0,24	0,236	0,275	0,246
	0,216	0,241	0,241	0,239	0,277	0,247
	0,227	0,241	0,242	0,241	0,277	0,248
	0,232	0,242	0,243	0,235	0,278	0,249
	0,219	0,242	0,243	0,236	0,28	0,251

**Tabela A7.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/SAL sobre o  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  da espécie *C. albicans*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	100,386	50,193	2	20661,931	<0,001	0,998	1,000
Tratamento	84,866	42,433	2	17467,413	<0,001	0,998	1,000
Interação	171,418	42,855	4	17641,009	<0,001	0,999	1,000
Resíduo	0,197	0,002	81				
Total	3206,099		90				

**Tabela A8.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/SAL sobre os valores de XTT da espécie *C. albicans*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	0,007	0,004	2	211,000	<0,001	0,770	1,000
Tratamento	1,438	0,719	2	42710,169	<0,001	0,999	1,000
Interação	0,001	0,000	4	15,158	<0,001	0,325	1,000
Resíduo	0,002	0,000	126				
Total	4,754		135				

**Tabela A9.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/CTAB sobre o  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  da espécie *C. glabrata*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	1,874	0,937	2	450,645	<0,001	0,918	1,000
Tratamento	101,799	50,900	2	24484,079	<0,001	0,998	1,000
Interação	2,122	0,530	4	255,134	<0,001	0,926	1,000
Resíduo	0,168	0,002	81				
Total	2883,852		90				

**Tabela A10.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/CTAB sobre os valores de XTT da espécie *C. glabrata*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	0,007	0,004	2	9,274	<0,001	0,128	0,975
Tratamento	1,160	0,580	2	1499,298	<0,001	0,960	1,000
Interação	0,006	0,001	4	3,713	0,007	0,105	0,874
Resíduo	0,049	0,000	126				
Total	3,551		135				

**Tabela A11.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/SAL sobre os valores de  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$  da espécie *C. glabrata*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	99,821	49,911	2	32674,011	<0,001	0,999	1,000
Tratamento	88,663	44,331	2	29021,666	<0,001	0,999	1,000
Interação	171,085	42,771	4	28000,230	<0,001	0,999	1,000
Resíduo	0,124	0,002	81				
Total	3233,057		90				

**Tabela A12.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação do FS CUR/SAL sobre os valores de XTT da espécie *C. glabrata*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	0,066	0,033	2	2833,031	<0,001	0,978	1,000
Tratamento	1,195	0,597	2	51048,196	<0,001	0,999	1,000
Interação	0,023	0,006	4	483,221	<0,001	0,939	1,000
Resíduo	0,001	0,000	126				
Total	5,986		135				

**Tabela A13.** Valores originais de ufc/mL de capacidade de adesão e formação de biofilme das três cepas de *C. albicans* segundo o tratamento aplicado.

Avaliação	CaATCC		Ca15R		Ca10R	
	FS+L+	FS-L-	FS+L+	FS-L-	FS+L+	FS-L-
Adesão	2,29E+05	2,22E+05	3,90E+02	2,26E+06	3,10E+02	2,35E+06
	2,52E+05	2,16E+05	4,80E+02	2,36E+06	4,10E+02	2,36E+06
	2,22E+05	2,15E+05	3,40E+02	2,57E+06	3,10E+02	2,55E+06
	2,43E+05	1,92E+06	3,60E+02	2,29E+06	4,00E+02	2,22E+06
	2,16E+05	2,17E+06	3,90E+02	2,51E+06	4,40E+02	2,48E+06
	2,46E+05	2,26E+06	3,50E+02	2,43E+06	3,60E+02	2,43E+06
Biofilme	2,37E+05	3,24E+06	6,60E+02	2,01E+06	4,00E+02	2,41E+06
	2,38E+05	3,14E+06	7,80E+02	2,15E+06	7,30E+02	2,48E+06
	2,58E+05	3,23E+06	6,50E+02	2,04E+06	6,00E+02	2,46E+06
	2,29E+05	3,22E+06	4,10E+02	2,20E+06	5,40E+02	2,59E+06
	2,26E+05	3,38E+06	4,60E+02	2,24E+06	6,00E+02	2,48E+06
	2,34E+05	3,25E+06	4,30E+02	2,33E+06	7,50E+02	2,57E+06

**Tabela A14.** Valores originais de ufc/mL de capacidade de adesão e formação de biofilme das três cepas de *C. glabrata* segundo o tratamento aplicado.

Avaliação	CgATCC		Cg50R		Cg63R	
	FS+L+	FS-L-	FS+L+	FS-L-	FS+L+	FS-L-
Adesão	1,42E+05	4,00E+05	2,70E+02	2,23E+06	2,08E+05	2,55E+06
	1,37E+05	3,75E+05	2,00E+02	2,51E+06	1,94E+05	2,77E+06
	1,32E+05	3,92E+05	1,50E+02	2,52E+06	2,00E+05	2,76E+06
	1,80E+05	3,81E+05	3,20E+02	2,17E+06	1,96E+05	2,44E+06
	1,97E+05	3,87E+05	2,10E+02	2,24E+06	2,05E+05	2,57E+06
	2,31E+05	3,78E+05	1,80E+02	2,37E+06	2,07E+05	2,48E+06
Biofilme	1,78E+06	3,56E+06	1,01E+03	2,43E+06	2,55E+05	2,33E+06
	2,01E+06	3,68E+06	9,60E+02	2,48E+06	2,30E+05	2,22E+06
	2,04E+06	3,71E+06	1,11E+03	2,51E+06	2,43E+05	2,39E+06
	1,93E+06	3,52E+06	1,01E+03	2,57E+06	1,94E+05	2,20E+06
	2,05E+06	3,81E+06	9,50E+02	2,44E+06	2,06E+05	2,10E+06
	2,18E+06	3,83E+06	1,05E+03	2,38E+06	2,08E+05	2,21E+06

**Tabela A15.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação da capacidade de adesão das cepas de *C. albicans*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	65,152	65,152	1	1297,601	<0,001	0,977	1,000
Tratamento	10,088	5,044	2	100,460	<0,001	0,870	1,000
Interação	22,390	11,195	2	222,963	<0,001	0,937	1,000
Resíduo	1,506	0,050	30				
Total	946,431		36				

**Tabela A16.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação da capacidade de formação de biofilme das cepas de *C. albicans*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	69,862	69,862	1	16539,672	<0,001	0,998	1,000
Tratamento	15,323	7,661	2	1813,839	<0,001	0,992	1,000
Interação	12,219	6,110	2	1446,456	<0,001	0,990	1,000
Resíduo	0,127	0,004	30				
Total	1004,846		36				

**Tabela A17.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação da capacidade de adesão das cepas de *C. glabrata*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	30,342	30,342	1	7244,35	<0,001	0,996	1,000
Tratamento	14,358	7,179	2	1714,10	<0,001	0,991	1,000
Interação	22,587	11,293	2	2696,40	<0,001	0,994	1,000
Resíduo	0,126	0,004	30				
Total	1042,413		36				

**Tabela A18.** Sumário da ANOVA a dois fatores (Cepa e Tratamento) para avaliação da capacidade de formação de biofilme das cepas de *C. glabrata*.

	SQ	QM	GL	F	<i>p</i>	$\eta^2 p$	$\pi$
Cepa	21,700	21,700	1	28121,040	<0,001	0,999	1,000
Tratamento	18,681	9,340	2	12104,042	<0,001	0,999	1,000
Interação	15,976	7,988	2	10351,429	<0,001	0,999	1,000
Resíduo	0,023	0,001	30				
Total	1209,774		36				