



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Ana Paula Dias Ribeiro

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre
culturas planctônicas e biofilmes de bactérias e
fungos utilizando curcumina e cloro-alumínio
ftalocianina veiculada por nanoemulsões

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Reabilitação Oral
– Área de Prótese, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para
obtenção do título de Doutor em
Reabilitação Oral (Área de
Concentração: Prótese).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Pavarina

Araraquara
2012

Ribeiro, Ana Paula Dias

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas planctônicas e biofilmes de bactérias e fungos utilizando curcumina e cloro-alumínio ftalocianina veiculada por nanoemulsões / Ana Paula Dias Ribeiro.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

162 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina

1. Fotoquimioterapia 2. Veículo farmacêutico 3. *Cândida albicans*
4. *Staphylococcus aureus* 5. *Staphylococcus aureus* resistente à
metecilina 6. Curcumina I. Título

ANA PAULA DIAS RIBEIRO

Efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas planctônicas e biofilmes de bactérias e fungos utilizando curcumina e cloro-alumínio ftalocianina veiculada por nanoemulsões

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de doutor

Presidente e Orientadora: Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Lúcia Machado

3º Examinador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Jr.

4º Examinador: Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos

5º Examinador: Profa. Dra. Soraya Coelho Leal

Araraquara, 30 de março de 2012.

Dados Curriculares

Ana Paula Dias Ribeiro

NASCIMENTO	5.7.1983 – Patos de Minas, Minas Gerais
FILIAÇÃO	Paulo Cesar Ribeiro Márcia Helena Caixeta Dias Ribeiro
2001/2005	Graduação em Odontologia pela Universidade de Brasília-UnB
2006	Estágio de Atualização na disciplina de Prótese Parcial Fixa da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP
2007/2009	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2008/2011	Estágio de Docência na disciplina de Prótese Parcial Removível da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP
2009/2012	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À Deus,

Senhor, obrigada por todas as vitórias conquistadas, por todos os sonhos realizados, por todas as provações vencidas, por ser a razão do meu viver e o Deus da minha vida.

Hoje sei que fui capaz de chegar até aqui porque o Senhor esteve comigo sempre, pois tudo posso naquele que me fortalece...

“...Mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.”

Isaías 40.31

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Márcia e Paulo,

Pelo amor incondicional, pela oportunidade em realizar esse sonho, por sempre me apoiarem e torcerem por mim, pelas palavras de carinho na hora certa e pela motivação. Obrigada por todas as renúncias que fizeram por mim, pelas orações, pelo silêncio no meu desabafo e pelo conforto no meu cansaço. Vocês são o meu porto seguro. Essa vitória é nossa e se hoje trago orgulho a vocês, isso é resultado do amor que me foi dado. Amo vocês mais que qualquer coisa no mundo e hoje sou mais feliz em tê-los por perto novamente e poder realizar o sonho de construir minha família ao lado dos que já fazem parte dela...

“Os filhos não precisam de pais gigantes, mas de seres humanos que falem a sua linguagem e sejam capazes de penetrar-se o coração.”

Augusto Cury

Dedico este trabalho...

Às minhas irmãs Ana Cecília e Ana Luisa,

Por serem meus presentes de Deus, meu dividir, meu compartilhar, meu compreender e meu respeitar as diferenças...

Ter vocês na minha vida fez toda diferença e se hoje sou o que sou é porque pude aprender com vocês. Obrigada por todas as alegrias e tristezas compartilhadas, pela amizade e amor e por sempre estarem ao meu lado.

Amo vocês.

“Eu agora sei bem que os melhores brinquedos são os irmãos.

Brinquedos vivos, que dão e recebem, que nos fazem crescer e crescem também pelas nossas mãos. Que se transformam depois em grandes amigos para toda a vida, em companhia sempre presente de uma maneira ou de outra, em refúgio e estímulo.”

Paulo Geraldo

Dedico este trabalho...

Ao meu amor Domingos,

Obrigada por todos esses anos que você compartilhou ao meu lado durante o curso de Mestrado e Doutorado. Obrigada pela paciência, companheirismo, lealdade e incentivo. Tenha certeza de que você e os nossos sonhos foram minha motivação maior e meu presente que hoje levo para viver ao meu lado. Amo você, meu amor, meu companheiro, meu amigo e meu futuro marido...

*“O que há dentro do meu coração, eu tenho guardado pra te dar
E todas as horas que o tempo tem pra me conceder,
são tuas até morrer...*

*Te adoro em tudo, tudo, tudo, quero mais que tudo, tudo, tudo
Te amar sem limites, viver uma grande história
Aqui ou noutra lugar que pode ser feio ou bonito
Se nós estivermos juntos, haverá um céu azul
Um amor puro não sabe a força que tem
Meu amor eu juro ser teu e de mais ninguém ”*

Djavan

Agradecimentos Especiais

Á minha orientadora Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina. Obrigada pelo carinho, pela dedicação, por acreditar no meu potencial, por me incentivar a buscar sempre mais e me proporcionar todo suporte para avançar. Esses 5 anos de convivência só fizeram aumentar o respeito e admiração por você; seu apoio e exemplo foram muito importantes para minha formação como professora e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco e ao Prof. Iguatemy Lourenço Brunetti, agradeço pela ajuda na busca por novos fotossensibilizadores, e pela participação no planejamento dos experimentos e nas discussões dos resultados, fundamentais para a execução deste estudo.

Aos professores do grupo de óptica, em especial ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, agradeço pela disponibilidade na confecção dos aparelhos de iluminação e pela oportunidade de discussão dos projetos, que tornaram possível a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa. Obrigada por me receber com tanto carinho em seu laboratório, por me permitir crescer, por seu incentivo e sua dedicação e por todas as oportunidades para crescimento profissional que me foram proporcionadas. Você é um exemplo de professor, orientador, pesquisador e amigo. Minha admiração e eterna gratidão.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, Profa. Dra. Ana Lúcia Machado, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, Profa. Dra. Eunice Terezinha

***Giampolo.** Obrigada por me incentivarem a buscar sempre mais e pelo apoio durante todo a pós-graduação.*

*À **Mariana Carvalho Andrade**, minha amiga e companheira de todos os momentos felizes e tristes. Você foi essencial para o desenvolvimento dessa tese. Obrigada por dividir comigo todas as lutas e vitórias, por estar ao meu lado e por me incentivar sempre! Ainda que a distância nos separe, você estará sempre no meu coração. Muito obrigada!*

*À **Julhiany**, pela ajuda nas metodologias com citômetro de fluxo, pelas horas de conversa no laboratório, pelos momentos de reflexão e discussão dos resultados. Obrigada!*

*À **Lívia**, por todos os ensinamentos passados ao longo da pós-graduação, pelas reflexões sobre o caminho acadêmico, pelo incentivo em buscar novos caminhos. Muito obrigada pela disposição em ajudar!*

*Ao **Fernando Primo**, pela ajuda na formulação da ftalocianina e com todos os dados referentes aos veículos farmacêuticos, as nanoemulsões. Muito obrigada!*

*Mais uma vez **a minha querida família e ao meu amor**. Com a ajuda de vocês e o suporte emocional tudo ficou bem mais fácil. Amo vocês mais que tudo!*

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Claudio Martins Segalla e sua Vice-Diretora, Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva e pelo Vice-Chefe Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Jr.

À Coordenação do Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo coordenador Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e pela Vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos de doutorado, pelo auxílio para realização do meu estágio no exterior e pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas da minha turma de Doutorado em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Ana Lúcia, André, Antônio, Cadu, Camilinha, Carol, Cris, Flávia Medeiros, Fe, Juliano, Paty e Rodrigo, por todos os momentos divididos durante esses anos, pelo companheirismo, pela amizade e pelo carinho.

À Livia, Juliana, Fernanda Alves, Camilo, Mari e Cris, pelos momentos compartilhados no laboratório na busca por respostas nesse mundo novo e vasto da Terapia Fotodinâmica. Sem a ajuda de vocês seria praticamente impossível a realização desse trabalho. Muito obrigada de coração!

Aos meus companheiros do laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais Adriano Lima, Carol, Cleverton, Di, Elaine, Fer Basso, Fê Vargas, Joyce, Juzinha, Ju, Liege, Nancita, Pedro, Popitas, pelos experimentos que deram certo, por aqueles que deram errado, pelas divertidas ou não muito reuniões de terça-feira, pelos lanchinhos, enfim por momentos de alegria que vivemos no laboratório.

*Ao Instituto de Física de São Carlos-USP, representados pelo **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**, pelo apoio tanto na metodologia quanto na discussão dos resultados desse estudo. Gostaria de agradecer a todos do grupo de Biofotônica e a todos os funcionários do Instituto de Física que auxiliaram no desenvolvimento desse estudo.*

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, da Biblioteca, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, do Departamento de Fisiologia e Patologia e da Portaria. Obrigada pelo apoio, carinho e dedicação. Com certeza a execução desse estudo se tornou mais agradável com vocês por perto!

Aos queridos amigos de Araraquara, Carolzita, Camilinha, Celsão, Cibele, Di, Fer Basso, Juzinha, Leila, Mari, Nancita, Popitas, Re. Com a presença de vocês na minha vida, tudo se tornou muito mais agradável. Obrigada pelos jantares, pela hospedagem, pelas noites de vinho, pelas conversas e desabafos, pelo ombro amigo, pelas broncas... Apesar da distância, vocês estarão sempre no meu coração.

Aos amigos e amigas de Brasília, Cássia, Fe Sesc, Fe Gomide, Jack, Renats, Kelly, Jana, Ma, Quel, Pipi, Tiago, Tie, Tuca, Danilo, Regino, e todos os outros. Muito obrigada pela torcida, pelas risadas, companheirismo, apoio, dedicação e incentivo. A amizade de vocês significa muito pra mim!

*À **Profa. Dra. Silvana** e ao **Prof. Dr. Luiz André**, pela recepção, carinho, confiança e compreensão durante meu estágio na Carolina do Norte. Muito obrigada pela oportunidade de realizar um sonho!*

*Ao **Prof. Dr. Steven Offenbacher** e toda sua equipe do laboratório, incluindo **Russ, Nicole, Joyce, David, Alan, Prof. Dr. Jim Back** e **Prof. Dr. Salvador Nares**, pelo carinho e por me receberem de portas abertas em seu laboratório.*

*Aos amigos **Daniela Vivaldi, Daniela Mendonça** e **Gustavo**. Muito obrigada pela ajuda e por compartilhar a casa de vocês comigo durante os 3 meses longe da minha família.*

*À **toda minha família** que acompanhou de pertinho todos esses anos.*

*À **minha nova família de Taquaritinga**. Obrigada por me fazerem me sentir em casa e cuidarem tanto de mim.*

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meu sincero agradecimento.

“Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar o nosso destino, se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais. É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho; de examinar com atenção a vida real; de confrontar nossa observação com nosso sonho; de realizar escrupulosamente nossa fantasia.

Sonhos, acredite neles.”

Vladimir Ulianov Lênin

Sumário

Resumo.....	15
Abstract.....	19
1 Introdução.....	22
2 Proposição.....	29
3 Capítulos.....	31
3.1 Capítulo 1.....	31
3.2 Capítulo 2.....	51
3.3 Capítulo 3.....	83
4 Discussão.....	104
5 Conclusão.....	117
6 Referências.....	120
7 Apêndices.....	130



Resumo

Ribeiro APD. Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre culturas planctônicas e biofilmes de bactérias e fungos utilizando curcumina e cloro-alumínio ftalocianina veiculada por nanoemulsões [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Resumo

Esta investigação teve os seguintes objetivos: 1. avaliar *in vitro* o efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) utilizando diferentes concentrações de curcumina e doses de luz LED na inativação de suspensões planctônicas de *S. aureus* resistente (MRSA) e susceptível à meticilina (MSSA) e a citotoxicidade dos parâmetros antimicrobianos dessa terapia em cultura celular de fibroblastos; 2. o efeito fotodinâmico da cloro-alumínio ftalocianina (CIAIFt) veiculada em nano-emulsão catiônica e aniônica e comparar com CIAIFt diluída em solvente orgânico na inativação da *C. albicans* quando em suspensão planctônica e organizados em biofilmes; 3. o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica utilizando a cloro-alumínio ftalocianina em sistema de nanoemulsão em culturas planctônicas e biofilmes de bactérias gram-positivas (MSSA e MRSA). No primeiro estudo, suspensões de MSSA e MRSA foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina (entre 0,1 a 20,0 μM) e expostas a diferentes fluências de LED azul (18; 25 e 37,5 J/cm^2). Em seguida, diluições seriadas foram obtidas e alíquotas de 25 μl de cada diluição foram plaqueadas em meio de cultura Mannitol Salt Agar. Após o período de incubação de 48 horas a 37°C, as unidades formadoras de colônias foram determinadas (UFC/mL). Para as células L929, essas foram incubadas por 20 minutos com curcumina e irradiadas em seguida com LED (37,5 J/cm^2). A viabilidade celular após a PDT foi avaliada utilizando o teste de MTT e as alterações morfológicas foram avaliadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados foram submetidos à análise descritiva, Análise de Variância (ANOVA) e *post hoc* de Tukey ($\alpha= 5\%$). As concentrações de 5, 10 e 20 μM resultaram em completa inativação do MSSA quando associadas a qualquer fluência de energia avaliada. Entretanto, somente a concentração de 20 μM associadas a dose de luz de 37,5 J/cm^2 resultou em completa inativação do MRSA. Essa associação resultou em 80% de redução dos fibroblastos. Além disso, alterações na morfologia celular foram observadas,

indicando que a membrana citoplasmática foi o principal alvo dessa terapia. Os controles de luz e curcumina não causaram alterações significativas tanto na contagem de colônias quanto nos valores do metabolismo celular. No segundo estudo, suspensões de *C. albicans* foram tratadas com a cloro-alumínio ftalocianina (CIAIFt) na concentração de 31,8 μM encapsulada em nanoemulsões (NE) de caráter catiônico e aniônico e a CIAIFt livre por 30 minutos no escuro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para remoção do fármaco e 300 μl de solução salina foi adicionado previamente à irradiação com LED ($660 \pm 3 \text{ nm}$; 50 e 100 J/cm^2). Amostras controle negativo não foram expostas a CIAIFt nem luz. Para as soluções planctônicas, as colônias foram determinadas (UFC/mL) após 48 horas de incubação. Além disso, o metabolismo celular foi avaliado por meio do teste de XTT e a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para avaliar danos a membrana celular. Para os biofilmes, a atividade metabólica foi avaliada pelo XTT e a distribuição da CIAIFt utilizando os diferentes veículos no interior dos biofilmes foi analisada por microscopia confocal. Os dados de CFU/mL e os valores de absorbância obtidos pelo teste de XTT foram analisados pelo Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas dos postos médios. Já para a citometria de fluxo foi utilizado ANOVA um critério ($\alpha = 0,05\%$). A viabilidade fúngica foi dependente do veículo, da carga superficial e dose de luz. A CIAIFt livre inativou completamente o fungo quando associada a maior dose de luz. Já a NE catiônica causou redução significativa tanto de CFU/mL ($\sim 3,1 \text{ log}$) quanto do metabolismo celular em cerca de 92,3% quando comparada ao controle ($p < 0,05$). Além disso, ambas as veiculações resultaram em danos a membrana citoplasmática significativos ($p < 0,05$). Para os biofilmes, a NE catiônica resultou em redução de 70% do metabolismo. A FS aniônica não apresentou atividade antifúngica. As imagens obtidas pela microscopia confocal demonstraram diferentes padrões de acúmulo e intensidade de fluorescência no interior dos biofilmes para os diferentes sistemas de veiculação de fármacos avaliados. No estudo 3, suspensões e biofilmes de MSSA e MRSA foram tratados com a CIAIFt livre e com os sistemas de NE catiônico e aniônico contendo esse fármaco. Após o período de pré-incubação, o fármaco foi removido e a irradiação foi realizada por um sistema de LED ($660 \pm 3 \text{ nm}$). Para as suspensões planctônicas bacterianas, foi avaliado o número de unidade formadoras de colônias (UFC/mL) e o metabolismo celular pelo teste de XTT. Já para os biofilmes, foi avaliado o metabolismo pelo XTT. Assim como para o fungo, a eficiência da PDT

foi dependente do veículo, carga superficial e dose de luz. A NE catiônica e a CIAIFt livre causaram completa inativação de ambas as cepas de *S. aureus*. Para os biofilmes, a NE catiônica reduziu em cerca de 80 e 73% o metabolismo celular da cepa susceptível e da resistente, respectivamente. A NE aniônica, apesar de reduzir em cerca de 4 log e 1 log o número de UFC/mL para o MSSA e MRSA, respectivamente, não causou redução do metabolismo dos biofilmes do MRSA mesmo quando associada a maior dose de luz avaliada. Esses resultados sugerem que a NE catiônica representa uma veiculação viável para inativação de fungos e bactérias, incluindo cepas resistentes aos tratamentos convencionais.

Palavras chave: Fotoquimioterapia, Veículo Farmacêutico, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina, Curcumina.



Abstract

Ribeiro APD. Effect of antimicrobial photodynamic therapy against planktonic and biofilm cultures of bacteria and fungi mediated by curcumin and aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Abstract

The aim of this investigation was to evaluate: 1. the Photodynamic Therapy (PDT) mediated by curcumin for in vitro inactivation of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and susceptible *S. aureus* (MSSA) and its cytotoxic effects against L929 fibroblasts; 2. the photodynamic potential of aluminum-chloride-phthalocyanine (CIAIPc) entrapped in cationic and anionic nanoemulsions (NE) to inactivate *C. albicans* planktonic and biofilm cultures compared with free CIAIPc; 3. the photodynamic effect of CIAIPc encapsulated in NE on methicillin susceptible and resistant *S. aureus* suspensions and biofilms. In the first study, suspensions of MSSA and MRSA were treated with different concentrations of curcumin and exposed to LED. Serial dilutions were obtained from each sample, and colony counts were quantified. For fibroblasts, the cell viability subsequent to the curcumin-mediated photodynamic therapy was evaluated using the MTT assay and morphological changes were assessed by SEM analysis. Curcumin concentrations ranging from 5.0 to 20.0 μM in combination with any tested LED fluences resulted in photokilling of MSSA. However, only the 20.0 μM concentration in combination with highest fluence resulted in photokilling of MRSA. This combination also promoted an 80% reduction in fibroblast cell metabolism and morphological changes were present, indicating that cell membrane was the main target of this phototherapy. In the second study, fungal suspensions were treated with different types of delivery systems containing CIAIPc. After 30 minutes, the drug was washed-out and samples were illuminated with LED source ($660 \pm 3 \text{ nm}$). Negative control samples were not exposed to CIAIPc or light. For planktonic suspensions, colonies were counted (CFU/ml) and cell metabolism was evaluated by XTT assay. (Kruskal-Wallis and Multiple Comparison test; $\alpha= 0.05\%$). Flow cytometry was used to evaluate damage to cell membrane. (One-way ANOVA; $\alpha= 0.05\%$). For biofilms, the metabolic activity was evaluated by means of XTT reduction assay and CIAIPc distribution

using the different delivery systems through three-dimensional architecture of the biofilms were analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Fungal viability was dependent on the delivery system, superficial charge and light dose. Free CIAIPc caused photokilling of the yeast when combined with a higher light dose. Cationic NE-CIAIPc reduced significantly both CFU/mL ($\sim 3.1 \log_{10}$) and cell metabolism (92.3%) compared with the negative control ($p < 0.05$). In addition, cationic NE-CIAIPc and free-CIAIPc caused significant damage to the cell membrane ($p < 0.05$). For the biofilms, cationic NE-CIAIPc reduced cell metabolism by 70%. Anionic NE-CIAIPc did not present antifungal activity. CLSM showed different accumulation and fluorescence intensities emissions on biofilm structure for the evaluated delivery systems. In the third study, suspensions and biofilms of MRSA and MSSA were treated with different delivery systems containing CIAIPc. After the pre-incubation period, the drug was washed-out and irradiation was performed with LED source ($660 \pm 3 \text{ nm}$). Negative control samples were not exposed to CIAIPc or light. For the suspensions, colonies were counted (CFU/mL). The metabolism of *S. aureus* suspensions and biofilms were evaluated by the XTT assay. The efficiency was dependent on the delivery system, superficial load and light dose. Cationic NE-CIAIPc and free-CIAIPc caused photokilling of the both strains of *S. aureus*. For biofilms, cationic NE-CIAIPc reduced cell metabolism by 80 and 73% of susceptible and resistant strains, respectively. Although anionic NE-CIAIPc caused a significant CFU/mL reduction for MSSA and MRSA, it was not capable of reducing MRSA biofilm metabolism. CIAIPc entrapped in cationic NE or in its free form combined with LED caused photokilling of both *S. aureus* strains evaluated and reduction of the metabolic activity of biofilms. This therapy may represent an alternative treatment for eradicating resistant strains.

Key words: Photochemotherapy, Pharmaceutical Vehicles, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Curcumin.



1 Introdução

1 Introdução

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma modalidade de tratamento que combina a utilização de um fármaco fotossensível e luz visível em um determinado comprimento de onda. Essa terapia surgiu inicialmente como tratamento minimamente invasivo de diversos tipos de tumores e lesões pré-cancerosas⁴⁹. A FDA (Food and Drug Administration) aprovou a PDT como tratamento para esôfago de Barrett, carcinomas obstrutivos de esôfago e traqueobrônquico, queratose actínica e degeneração macular nos EUA. Em outros países, a PDT também tem sido aplicada no tratamento de tumores de cabeça e pescoço quando em estágio inicial e para tratamento paliativo desse tipo de câncer^{3,6}.

O grande interesse nesta terapia advém da sua simplicidade de aplicação, além de apresentar-se como alternativa menos invasiva e destrutiva quando comparada as demais modalidades de tratamento de tumores, como cirurgia, quimio e radioterapia³⁵. Além disso, a PDT tem como vantagem o dano limitado ao tecido-alvo devido a maior captação do fotossensibilizador (FS) pelas células tumorais associada a irradiação localizada, o que reduz os efeitos adversos¹⁴. A toxicidade da PDT é resultado da interação entre o FS e luz com o oxigênio molecular presente no meio e compreende três fases: excitação do fármaco, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular¹². Na primeira fase, a fonte de luz transfere energia para o fármaco fotossensível, cujas moléculas absorvem essa energia e passam para um estado singleto excitado. Nesse estágio, as moléculas do FS podem retornar ao estado original e, dessa forma, liberar essa energia por fluorescência (princípio do fotodiagnóstico). Por outro lado, essas moléculas podem passar para o estado triplo excitado transferindo a energia absorvida para moléculas de oxigênio ou outras moléculas presentes no meio que vão reagir com o oxigênio. Essa última reação descrita é conhecida como reação do Tipo I e resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, como hidroxila, superóxido ânion e peróxido de hidrogênio. Na reação tipo II, o FS excitado pode reagir com oxigênio molecular e produzir oxigênio singleto, altamente reativo¹. Todos esses produtos formados, seja na reação tipo I ou na reação tipo II, geram uma sequência de eventos oxidativos resultando em morte

celular direta, destruição da vascularização do tumor e ativação da resposta imune do hospedeiro⁹.

Atualmente o campo de aplicação da PDT se tornou mais amplo devido ao aumento da resistência dos micro-organismos aos tratamentos convencionais resultante do uso indiscriminado dos antimicrobianos, o que levou ao desenvolvimento de tratamentos alternativos e coadjuvantes para inativação desses patógenos. O princípio da PDT antimicrobiana parte do pressuposto de que o FS se liga e penetra nas células bacterianas e fúngicas mais rapidamente que as células do hospedeiro. Assim, a iluminação da lesão infecciosa após a aplicação do fármaco fotossensível promove a morte dos micro-organismos sem causar danos as células normais subjacentes⁵⁵. As vantagens da PDT como tratamento antimicrobiano estão relacionadas a seu efeito bactericida e fungicida instantâneo, e a possibilidade de várias aplicações dessa terapia sem a indução de resistência por parte dos micro-organismos³⁴. Essa última característica é resultado do mecanismo de ação da PDT que age via produção de oxigênio singleto e outras espécies reativas. Esses radicais livres gerados interagem em diversas estruturas celulares (proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos) por diferentes mecanismos dificultando o desenvolvimento da resistência microbiana a essa terapia³⁹.

Dentre as bactérias que se destacam com relação à resistência aos antibióticos está o *Staphylococcus aureus*, considerado um dos patógenos humanos mais importantes, e comumente encontrado na cavidade bucal de aproximadamente 24 a 36% de pacientes saudáveis⁷⁶. A incidência dessa bactéria é ainda maior em pacientes portadores de próteses removíveis, uma vez que foi relatado que 48% dos indivíduos usuários de prótese apresentavam *S. Aureus*⁷². Infecções nos tecidos bucais como queilite angular, parotite e mucosite staphylococa são infecções comumente associadas à presença do *S. Aureus*⁷². Dessa forma, existem evidências científicas de que a cavidade bucal representa uma fonte de disseminação dessa espécie que é responsável por infecções em outros órgãos, como pneumonia por aspiração, endocardite, doenças crônicas de pulmão, entre outras⁷⁸.

Todas as estratégias para inativação do *S. aureus* se tornaram mais difíceis devido ao surgimento de cepas resistentes aos antibióticos. O *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) foi inicialmente isolado em 1961, e atualmente, apresenta alta prevalência em infecções hospitalares, sendo responsável pela elevada morbidade e mortalidade dessas infecções e aumento dos custos médico-

hospitalares⁴⁸. Sabe-se que a colonização precede a infecção, dessa forma, a descolonização pode reduzir o risco de infecção pelo MRSA em indivíduos e prevenir a infecção cruzada entre pacientes e profissionais da saúde. Dessa forma, para prevenir a colonização por cepas de *S. aureus* resistentes e susceptíveis à meticilina (MSSA), já foram propostos aplicação intranasal de mupirocina, banhos diários com soluções de clorexidina, antibioticoterapia com rifampicina e doxiciclina, uso de soluções higienizadores para próteses, procedimento de higiene bucal e métodos para esterilização de próteses^{43,48,71,81}. Entretanto, até o momento, não existe evidência suficiente para comprovar que o uso de terapia antimicrobiana tópica e sistêmica é eficiente na erradicação do MRSA⁴⁶.

Os fungos representam outra espécie de micro-organismo que deve ser considerada quando se trata de resistência aos tratamentos convencionais, principalmente os do gênero *Candida*. Essas espécies são responsáveis por infecções superficiais de mucosa e infecções invasivas com risco de morte, sendo a *Candida albicans* a espécie mais prevalente⁵⁴. Nos últimos anos houve um aumento na incidência das infecções fúngicas devido ao aumento da população imunossuprimida em resultado da infecção pelo HIV e dos tratamentos antineoplásicos. Estudos indicam que 84 a 100% de indivíduos HIV positivos desenvolvem ao menos um episódio de candidose pseudomembranosa¹³. Os tratamentos para a candidose utilizam medicação antifúngica tópica² e sistêmica⁸. Na terapia antifúngica tópica são utilizadas drogas como a nistatina e miconazol, porém, os resultados não tem sido satisfatórios devido aos efeitos diluentes da saliva e a recidiva da infecção é frequente. A medicação antifúngica sistêmica é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes, e utiliza medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B⁵⁸. No entanto, a utilização desses medicamentos deve ser cautelosa em razão da possibilidade de efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos. Além disso, um aspecto importante a ser analisado na terapia com antifúngicos tópicos ou sistêmicos se refere à resistência que as espécies de *Candida* podem apresentar a esses medicamentos.

Associado ao surgimento de espécies resistentes às terapias medicamentosas, a dificuldade em eliminar os micro-organismos também pode ser atribuída a forma de organização dos mesmos in vivo. Os biofilmes representam comunidades de micro-organismos estruturadas envoltas por uma matriz polimérica extracelular com características únicas que conferem diversas vantagens quando

comparados ao crescimento planctônico²⁰. Nos biofilmes, as espécies microbianas são altamente interativas e utilizam meios de sinalização intercelular conhecido mais comumente por “quorum sensing”⁵⁷. Esse fenômeno resulta em um comportamento coletivo dentro de uma população de micro-organismos promovendo melhor acesso aos nutrientes assim como uma defesa coletiva a outros organismos competidores (Williams 2007 dentro de Pereira). A maior relevância clínica dos biofilmes é sua alta resistência aos antimicrobianos, uma vez aproximadamente 65% das infecções microbianas estão associadas a presença de biofilmes^{11,67}.

Devido à elevada ocorrência das infecções e as deficiências apresentadas pelos tratamentos atualmente disponíveis, pesquisas tem sido direcionadas para o desenvolvimento de alternativas para o tratamento de infecções localizadas. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos patogênicos é a Terapia Fotodinâmica (PDT). Diversos fotossensibilizadores tem sido empregados em estudos de PDT antimicrobiana, dentre eles destacam-se as porfirinas^{4,10,22,84}, os fenotiazínicos^{19,73,85}, as ftalocianinas^{51,75,85} e o ácido 5-aminolevulínico (ALA)⁵⁶. As porfirinas são fármacos fotossensíveis da primeira-geração cuja banda de absorção está entre 610-630 nm, sendo o grupo mais avaliado atualmente. Seu mecanismo de ação consiste em promover um dano inicial a membrana citoplasmática, o qual permitirá a entrada do FS para o interior da célula. Com a continuidade da irradiação, esse FS causará danos intracelulares como a peroxidação lipídica, fotodegradação de esteróides insaturados e a inativação de proteínas da parede celular²¹. As porfirinas possuem algumas desvantagens relacionadas ao baixo comprimento de onda de excitação e a longa sensibilidade após sua aplicação. O grupo dos fenotiazínicos compreende os corantes como azul de metileno, azul de toluidina e outros. Assim como as porfirinas, se localizam preferencialmente na membrana, e durante a iluminação, alteram essa estrutura promovendo um aumento da permeabilidade celular e a conseqüente morte celular²¹. A desvantagem desse grupo é a possibilidade de corar tecidos e próteses, além de sua maior toxicidade na ausência de luz, o que diminui a eficiência terapêutica da PDT³⁶.

Sendo assim, pesquisas tem sido conduzidas com novos fotossensibilizadores que sejam mais seletivos aos micro-organismos, apresentem maior rendimento fotodinâmico e não sejam tóxicos. Pigmentos fotossensíveis, principalmente aqueles de origem natural e baixo custo, tem sido alvo de estudos. A Curcumina é um pigmento amarelo extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa*

(*Linn*), conhecida como açafrão da Índia e vem sendo empregada na culinária asiática e na medicina tradicional Indiana a décadas²⁴. O potencial terapêutico da curcumina tem sido investigado devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, imunomoduladoras e antimicrobianas⁶⁰. Estudos tem demonstrado que o efeito antimicrobiano pode ser potencializado em combinação com a luz, o que tem estimulado os pesquisadores a explorar a utilização desse pigmento em diversas áreas que incluem a fotoquímica e fotobiologia¹⁷.

Outro grupo de FS que tem sido estudado são as ftalocianinas, compostos químicos puros capazes de absorver luz em comprimentos de onda mais longos quando comparadas aos derivados da hematoporfirina. Esses compostos pertencem à segunda geração de fotossensibilizadores, os quais apresentam características superiores aos derivados da hematoporfirina quando se compara a banda de absorção do FS e sua seletividade e capacidade de ser eliminado do organismo⁴⁵. Consideradas como porfirinas de caráter aromático aumentado, as ftalocianinas possuem maior rendimento na produção de oxigênio singleto, sendo seu poder oxidativo aumentado quando comparado ao dos derivados da hematoporfirina^{18,47}.

Apesar das vantagens apresentadas pelas ftalocianinas, a maioria apresenta comportamento hidrofóbico que resulta na formação de agregados em meio aquoso. Com o fenômeno da agregação, ocorre uma redução da fotoatividade desses compostos, com menor produção de espécies reativas e conseqüente menor fotoinativação dos micro-organismos⁵². Dessa forma, tem sido propostos diversos sistemas de veiculação de fármacos, que contenham compartimentos hidrofóbicos para solubilização das ftalocianinas e mantenham as suas características hidrofílicas em soluções aquosas^{44,59,66}. Esses sistemas incluem os lipossomos, micelas poliméricas, nano-emulsões, microesferas e nano-partículas²⁶. Idealmente, esses sistemas de veiculação de fármacos deveriam ser biodegradáveis com mínima resposta imunogênica, incorporar o FS sem alteração da atividade do mesmo e fornecer um ambiente para que o FS seja administrado em sua forma monomérica¹². Dentre os sistemas existentes, as nano-emulsões representam um tipo de veículo de aplicação tópica que apresenta como características o aspecto cremoso¹⁶ e, dessa forma, podem ser empregadas em infecções superficiais de pele e mucosa.

Outra importante característica destes veículos é a possibilidade de alterar suas propriedades físicas, como a carga da superfície, aumentando a

possibilidade de interação entre o veículo e o micro-organismo. Sabe-se que as paredes celulares bacterianas e fúngicas possuem uma carga superficial residual negativa devido à presença de moléculas de caráter aniônico como o ácido teicóico para as Gram-positivas e o lipopolissacarídeo nas Gram-negativas⁴⁴. Dessa forma, veículos que apresentem carga superficial positiva tendem a se acumular em maior quantidade no interior das células dos micro-organismos e promover maior fotoinativação principalmente de bactérias Gram-negativas e dos fungos^{15,51,55,74}. Além da carga, as dimensões da veiculação pode permitir melhor penetração dos fármacos nos biofilmes, uma vez que esses apresentam estruturas porosas com canais que permitem a circulação de fluidos e metabólitos⁵⁰.

Diante do exposto, foram conduzidos estudos que avaliaram o potencial antimicrobiano da curcumina associada a luz em suspensões planctônicas de MSSA e MRSA (Capítulo 1). Além disso, foi avaliado o efeito fotodinâmico da cloroalumínio ftalocianina (CIAIFt) veiculada em nano-emulsão catiônica e aniônica na inativação de bactérias gram-positivas (MSSA e MRSA) e fungo (*C. albicans*) quando em suspensão planctônica e organizados em biofilmes (Capítulos 2 e 3).



2 Proposição

2 Proposição

De acordo com as informações apresentadas na seção anterior, esta investigação teve como objetivo avaliar dois fotossensibilizadores, curcumina e cloro-alumínio-ftalocianina, na fotoinativação de bactérias gram-positivas (MSSA e MRSA) e fungo (*C. albicans*). Para isso, três estudos foram propostos com os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico de diferentes concentrações de curcumina e doses de luz LED na inativação de suspensões planctônicas de bactérias gram-positivas (MSSA e MRSA) por meio de contagem de colônias (CFU/mL). Também avaliar a citotoxicidade dos parâmetros antimicrobianos dessa terapia em cultura celular de fibroblastos por meio da análise do metabolismo celular e da morfologia celular.

2. Avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico da cloro-alumínio ftalocianina (CIAIFt) veiculada em nano-emulsão catiônica e aniônica e comparar com CIAIFt diluída em solvente orgânico na inativação da *C. albicans* quando em suspensão planctônica e organizados em biofilmes. Além disso, determinar os possíveis danos a membrana citoplasmática da *C. albicans* por meio da análise por citometria de fluxo utilizando o fluorocromo iodeto de propídeo.

3. Avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica utilizando a cloro-alumínio ftalocianina em sistema de nanoemulsão em culturas planctônicas e biofilmes de bactérias gram-positivas (MSSA e MRSA) por meio da determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e pelo teste de XTT.



3 Capítulos

3.1 Capítulo 1

Phototoxic effect of Curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts*

Ana Paula Dias Ribeiro, MD

Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, SP, Brazil. apauladr@yahoo.com.br

Ana Cláudia Pavarina, PhD¹

Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, SP, Brazil. pavarina@foar.unesp.br

Livia Nordi Dovigo, PhD

Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, SP, Brazil. lidovigo@yahoo.com.br

Iguatemy Lourenço Brunetti, PhD

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil. brunetti@fcar.unesp.br

Vanderlei Salvador Bagnato, PhD

Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. vander@ifsc.usp.br

Carlos Eduardo Vergani, PhD

Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, SP, Brazil. vergani@foar.unesp.br

Carlos Alberto de Souza Costa, PhD

Department of Physiology and Pathology, Araraquara School of Dentistry, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil. casouzac@foar.unesp.br

¹Correspondence to: Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Rua Humaitá, 1680, CEP 14801-903, São Paulo, Brasil. Phone: +55-016-3301-6410. Fax: +55-016-3301-6406. E-mail: pavarina@foar.unesp.br

* Artigo submetido e aceito para publicação no periódico “Laser in Medical Science”.

Phototoxic effect of Curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts

Abstract: Photodynamic therapy has been investigated as an alternative method of killing pathogens in response to the multiantibiotic resistance problem. This study evaluated the photodynamic effect of curcumin on methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) compared to susceptible *S. aureus* (MSSA) and L929 fibroblasts. Suspensions of MSSA and MRSA were treated with different concentrations of curcumin and exposed to LED. Serial dilutions were obtained from each sample, and colony counts were quantified. For fibroblasts, the cell viability subsequent to the curcumin-mediated photodynamic therapy was evaluated using the MTT assay and morphological changes were assessed by SEM analysis. Curcumin concentrations ranging from 5.0 to 20.0 μM in combination with any tested LED fluences resulted in photokilling of MSSA. However, only the 20.0 μM concentration in combination with highest fluence resulted in photokilling of MRSA. This combination also promoted an 80% reduction in fibroblast cell metabolism and morphological changes were present, indicating that cell membrane was the main target of this phototherapy. The combination of curcumin with LED light caused photokilling of both *S. aureus* strains and may represent an alternative treatment for eradicating MRSA, responsible for significantly higher morbidity and mortality and increased healthcare costs in institutions and hospitals.

Key Words: MRSA; photodynamic therapy; curcumin; fibroblasts.

Introduction

Staphylococcus aureus, considered one of the most important human pathogens, is commonly found in the oral environment [1]. Although the major reservoirs of *S. aureus* are the anterior nares, this organism has been isolated from 24 to 36% of healthy oral cavities. This incidence increases in the presence of prosthetic devices, reaching up to 48% in denture-wearing patients [2]. Furthermore, *S. aureus* strains have been found in different patient groups, such as children, elderly and patients with systemic diseases and hematological malignancies [2]. Some oral infections are associated with *S. aureus*, such as angular cheilitis, endodontic

infection, parotitis and staphylococcal mucositis [2]. There is also scientific evidence that the oral cavity can be the source of the staphylococci responsible for infection at distant sites, such as aspiration pneumonia, endocarditis, acute septic arthritis and chronic lung diseases [3].

As the oral cavity can be an important reservoir of this opportunistic pathogen, much effort has been made in order to promote the decolonization of *Staphylococcus* carriers [4]. However, the strategies to eliminate the *S. aureus* strains have been challenged with the development of antibiotic-resistant microorganisms, such as the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Strains of MRSA were first detected in 1961 and these pathogens are currently prevalent worldwide [5]. MRSA has become a major problem in nosocomial infections as it is responsible for significantly higher morbidity and mortality and increased healthcare costs [6]. It is known that the colonization precedes the systemic infection and therefore decolonization may reduce the risk of MRSA infection in individual carriers and prevent cross-infection to other patients or healthcare workers. Intranasal mupirocin, daily chlorhexidine body wash, antibiotics such as rifampin and doxycycline, oral hygiene procedures, use of denture-cleansing agents and denture sterilization methods have been proposed to prevent colonization by MRSA and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) [6,7]. However, a systematic review concluded that there is insufficient evidence to support the use of any topical or systemic antimicrobial therapy for eradicating MRSA [8].

The photodynamic therapy (PDT) has emerged in the clinical field as a potential alternative to antibiotics for inactivating resistant microorganisms using a non-toxic light-sensitive compound (known as photosensitizer - PS), visible light and oxygen. Briefly, activation of the PS by a visible light that matches its photophysical properties generates reactive oxygen species (ROS) like free radicals by electron or hydrogen transfer (type I reaction) or reactive singlet oxygen by direct energy transfer to oxygen (type II reaction) [9]. Photodynamic inactivation of microorganisms has advantages, such as the local application of PS and light, which limits the action of ROS and avoids systemic effects on normal bacterial flora [10]. In addition, unlike antibiotics, which have a single target in the microbial cell, the reactive species generated by the photodynamic reaction have a multifunctional nature and can damage multiple cellular structures, reducing the chances of development of PDT-resistant strains [11]. Dovigo et al. [12] observed that fluconazole-resistant *C. albicans* and *C. glabrata* strains were sensitivity to PDT, although they were less susceptible

than non-resistant strains. At the same time, however, this is a limitation of PDT because the host cells are also susceptible to the action of ROS. Ribeiro et al. [13] found that PDT caused severe toxic effects in normal cell culture, characterized by the reduction of the mitochondrial activity, morphological alterations and induction of necrotic cell death. Therefore, the challenge in PDT is to find a therapeutic window, as a function of the incubation time, PS concentration and applied light dose, in which bacteria can be killed without causing cytotoxic effects to the host's surrounding healthy tissues [14].

Curcumin is a naturally occurring, intensely yellow pigment that is isolated from the rhizomes of the plant *Curcuma longa* (Linn) [15]. It is the active ingredient of the spice turmeric and is used worldwide as a cooking spice, flavoring agent and colorant [15]. Potential therapeutic applications of curcumin have been investigated due to its antiinflammatory, antioxidant, antimicrobial, antitumor [15] and antifungal properties [16]. It has also been proposed that the beneficial effects of curcumin are enhanced in combination with light activation, which has stimulated researchers to explore the use of this pigment in several areas including photochemistry and photobiology [17]. In this scenario, it would be of interest to investigate the phototoxicity of curcumin against a pathogen that is a leading cause of bacterial diseases, including oral infections, in humans. The aim of this study was to evaluate the photodynamic effect of curcumin in combination with light-emitting diode (LED) light on MRSA and MSSA as well as its potential cytotoxic effects on L929 fibroblasts.

Material and methods

Microorganisms

The microorganisms used in this study were methicillin-susceptible (MSSA; ATCC 25923) and methicillin-resistant (MRSA; ATCC 33591) *S. aureus* obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). These bacteria were individually inoculated in 5 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) and grown aerobically overnight at 37°C. Each culture was harvested after centrifugation at 2,000 rpm for 10 minutes, washed twice with sterile distilled water and resuspended in sterile saline to a turbidity of 10^6 cells mL⁻¹ (McFarland standard).

Cell Culture

Immortalized L929 fibroblasts purchased from the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, SP, Brazil) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Chemical Co.) supplemented with 10% bovine fetal serum (Gibco, Grand Island, NY, USA) with 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mmol/L glutamine (Gibco) in an humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). The cells were sub-cultured every 3 days until an adequate number of cells were obtained for the study. After reaching approximately 80% density, the cells were trypsinized, seeded in sterile 24-well plates (30,000 cells/cm²) and incubated for 72 hours.

Photosensitizer and light source

A stock solution of curcumin (200µM) was prepared in DMSO. On the day of the experiment, this solution was diluted in sterile saline to final concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 20 µM (keeping the final concentration of DMSO at 10%). A LED-based device with a predominant wavelength of 455 nm and composed of eight royal blue LEDs (LXHL-PR09, Luxeon[®] III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA) uniformly distributed into the device was used to excite the PS. The intensity of light delivered was 22 mW/cm².

Phototoxicity assay against MSSA and MRSA

Aliquots of 100 µL of MSSA suspension were individually transferred to separate wells of 96-well microtitre plates. An equal volume of each PS solution was added to each well to give final concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 20 µM. After dark incubation for 20 minutes (pre-irradiation time), each plate was placed on the LED device. The MSSA suspensions were subjected to three light fluences, 18.0, 25.5, and 37.5 J/cm². In order to determine whether curcumin alone had any effect on cell viability, additional wells containing one of the bacterial suspensions were exposed to curcumin identically to those described above, but not to LED light (C+L). The effect of LED light alone was also determined by exposing cells to light without being previously exposed to curcumin (C-L+). Suspensions exposed to neither curcumin nor LED light were considered as the negative control group (C-L-).

Based on the results of the experiments reported above, the three concentrations of curcumin that achieved the most promising results for MSSA

inactivation (5, 10, 20 μM) and the light fluence of 37.5 J/cm^2 were selected to be used against MRSA. The experimental protocol was carried out as described above and the experimental groups C+L+, C+L-, C-L+ and C-L- were evaluated. To determine MSSA and MRSA survival, aliquots of the contents of each well were serially diluted 10-fold in sterile saline to give dilutions of 10^{-1} to 10^{-3} times the original concentration. Triplicate 25 μL aliquots were plated onto Mannitol Salt agar plates. All plates were aerobically incubated at 37°C for 24 hours and thereafter colony counts of each plate were quantified using a digital colony counter (CP 600 Plus, Phoenix Ind Com Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil). The number of colony forming units *per* milliliter (CFU/mL) was determined.

Phototoxicity assay of L929 fibroblasts

For the L929 fibroblast cell line, after 48 hours of incubation, the culture medium was removed and cells were washed with phosphate buffer saline (PBS). Aliquots of 350 μL of curcumin at final concentrations of 5, 10 and 20 μM were transferred individually to wells of 24-well plates and were incubated in contact with the cells for 20 minutes protected from light. After incubation, cells were irradiated with a light fluence of 37.5 J/cm^2 . Additional wells containing cells exposed only to curcumin or only to LED light were also evaluated. Negative control group was composed of cells exposed to neither curcumin nor LED light.

For fibroblast culture, cell viability was evaluated by succinic dehydrogenase (SDH) production, which is a measure of the mitochondrial respiration of the cell. For such purpose, the methyltetrazolium (MTT) assay was used. In 10 wells, 900 μL of DMEM plus 100 μL of MTT solution (5 mg/mL sterile phosphate buffered saline - PBS) (Sigma Chemical Co.) were applied to the cells cultured in each well and incubated at 37°C for 4 hours. Thereafter, the culture medium (DMEM with the MTT solution) was aspirated and replaced by 600 μL of acidified isopropanol solution (0.04 N HCl) to dissolve the blue crystals of formazan present in the cells. Cell metabolism was determined as being proportional to the absorbance measured at 570 nm wavelength with an ELISA plate reader (BIO-RAD, model 3550-UV, microplate reader, Hercules, CA, USA).

For analysis of the L929 cell line morphology by SEM, sterile 12-mm-diameter cover glasses (Fisher Scientific) were placed on the bottom of the wells of all experimental and control groups immediately before seeding the cells. After the

experimental conditions, the culture medium was removed and the viable cells that remained adhered to the glass substrate were fixed in 1 mL of buffered 2.5% glutaraldehyde for 24 hours and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 hour. The cells adhered to the glass substrate were then dehydrated in a series of increasing ethanol concentrations (30, 50, 70, 95 and 100%) and immersed in 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS; Acros Organics, Springfield, NJ, USA) for 90 minutes and stored in a desiccator for 24 hours. The cover glasses were then mounted on metallic stubs, sputter-coated with gold and the morphology of the surface-adhered L929 cells was examined with a scanning electron microscope (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, Tokyo, Japan).

Data analysis and statistics

Bacterial cell counts were carried out in duplicate and repeated five times for each experimental condition. For the purpose of analysis, cfu/mL values were transformed into logarithm (\log_{10}). Data from microbiological evaluation (*S. aureus*) and cytotoxicity test (L929 fibroblasts) presented a normal distribution and were analyzed statistically by ANOVA and Tukey post hoc tests. P values of <0.05 were considered significant.

Results

Phototoxicity against MSSA and MRSA

The three highest concentrations of curcumin (5, 10 and 20 μM) in combination with any of the light fluences (18.0, 25.5 and 37.5 J/cm^2) resulted in complete elimination of MSSA. In these cases, the log reduction achieved was over 6 logs. The association of lower curcumin concentrations (0.1, 0.5 and 1 μM) with light decreased the MSSA viability (CFU/mL counts) in a dose-dependent manner (Fig. 1). In these experimental conditions, the highest log reduction observed was approximately of 5 logs corresponding to MSSA exposed to 1 μM of curcumin at 25.5 J/cm^2 . Colony counts of MSSA exposed only to LED light or curcumin was not different from the negative control group (Table 1), indicating that only the combination of curcumin with light was able to cause a significant reduction on CFU/mL counts.

For MRSA, the concentration of 20 μM combined with illumination (37.5 J/cm^2) caused the total inactivation of bacterial suspensions. The other two

concentrations (5 and 10 μM) significantly reduced the CFU/mL counts (Fig. 2). The log reduction achieved was of 6.7, 8.3, and 9.8 logs for the curcumin concentrations of 5, 10 and, 20 μM , respectively. The C+L-, C-L+ and C-L- showed no significant changes in cell numbers throughout the course of the experiment.

Phototoxicity against L292 cell line

Figure 3 presents the effect of PDT (C+L+), different curcumin concentrations (C+L), and LED light (C-L+) on cell viability. Considering the negative control group (C-L-) as having 100% of cell viability, the metabolic activity of the L929 cells decreased by 68.1, 75.1 and 80% when exposed to 5, 10, and 20 μM curcumin concentrations in combination with blue LED light, respectively. In those groups, there was no statistically significant difference ($p>0.05$) among the curcumin concentrations (5, 10, and 20 μM). The toxicity of curcumin without exposure to light was also evaluated and no significant difference ($p>0.05$) was observed compared with the negative control group.

Figure 4 (a-d) is a composite figure of SEM micrographs of the L929 fibroblasts representative of the experimental and control groups. For the negative control group (no treatment) and the group treated only with curcumin (20 μM), numerous L929 fibroblasts that remained adhered to the glass substrate exhibited a spindle-shaped appearance with few cytoplasmic processes originating from the membrane (Fig. 4a,b). Arrows indicate mitoses occurring in both groups. In the groups subjected to PDT, a smaller number of L929 fibroblasts remained adhered to the cover glass. In some areas of the glass substrate, rests of cytoplasmic membrane of dead cells were observed (Fig. 4c,d).

Discussion

The present *in vitro* study showed the efficacy of PDT using curcumin at a final concentration of 20 μM and blue LED light in promoting photokilling of MSSA and MRSA strains. Curcumin has been extensively investigated for therapeutic applications due to its antiinflammatory, antitumor and antimicrobial effects [18]. The antimicrobial action of this substance is directly related to its combination or not with excitation by a visible light source [17]. Wang et al. [19] found that the minimum inhibitory concentration (MIC) of curcumin against *S. aureus* without illumination was 62.5 mg/L. Another study confirmed the antifungal action of curcumin and found

that its MIC against different *Candida* spp. species without light activation ranged from 32 to 256 mg/L [16].

On the other hand, when used in combination with visible light, the concentration of curcumin required to promote photoinactivation of bacteria is reduced to the micromolar level, as demonstrated in the present study. On irradiation with blue LED light, curcumin caused cytotoxic effects to both MSSA and MRSA and its phototoxicity was expressed in a PS concentration-, light fluence- and bacterial strain-dependent manner. A 5 μM concentration of curcumin used in combination with the lowest energy density (18 J/cm^2) was sufficient to promote photokilling of MSSA. The capacity of curcumin exerting potent phototoxic effects in micromolar amounts when illuminated by a visible light source has been described [17,20]. Haukvik et al. [20] evaluated photokilling of gram-positive *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus intermedius* and gram-negative *Escherichia coli* after treatment with curcumin and blue light illumination and found that a 2.5 μM concentration was sufficient to kill the gram-positive bacteria, while a 25 μM concentration was necessary for *E. coli*. Only one study has so far evaluated the photokilling of *S. aureus* by curcumin [17] and the authors observed that washout of curcumin before illumination resulted in minimal reduction of bacterial counts (CFU/mL), even after a 90-minutes pre-incubation period with the PS. This result suggests that the photodynamic effect is greatly increased when curcumin is present during light application. Curcumin phototoxicity to bacterial strains seems to be mediated by the excited states of curcumin and/or products derived from the subsequent reactions with oxygen during irradiation [18]. This way, light is responsible for the triplet excited state of curcumin, resulting in energy or electron transfer to molecular oxygen with consequent formation of ROS, which ultimately cause destruction of microbial cells [21].

In the present study, a higher curcumin concentration (20 μM) combined with illumination at 37.5 J/cm^2 was necessary for photodynamic inactivation of MRSA, which means that the methicillin-resistant strain was more resistant to PDT than the MSSA, requiring a 4-fold higher concentration of the PS to be inactivated. Recent studies have reported that higher concentrations of PS were necessary for killing of MRSA compared with MSSA strains [14, 22]. Grinholc et al. [14] reported that the response of different MSSA and MRSA strains to PDT was not homogenous, and 0 to 3 \log_{10} -unit reduction in viable counts was observed when a porphyrin was used as a

PS for photodynamic inactivation of the bacteria. Those authors observed more PDT-resistant MRSA strains compared with the MSSA strains, as observed in the present study. Tsai et al. [22] also found that the PDT susceptibility of MRSA strains was lower than the other antibiotic-susceptible strains. This greater resistance of MRSA strains to PDT has been related to the capsular polysaccharide structure on the bacterial cell surface, which would limit the penetration of the PS into the MRSA cells, reducing the toxic effects of the ROS generated during photodynamic inactivation [23]. The need for higher light fluences and drug concentration for resistant strains have been also observed for yeasts, showing that fluconazole-resistant *C. albicans* and *C. glabrata* strains had reduced sensitivity to PDT [12]. It is accepted that PDT is a non-specific and effective treatment against both susceptible and resistant pathogen [22]. Until now, the studies reported that PDT effect is strain and isolate-dependent. In our study, the ATTC evaluated strains presented the behavior of susceptible bacteria being more sensitive to PDT treatment than the resistant bacteria. However, Grinholc et al. [14] reported on MRSA isolates highly sensitive to PDT, whereas there are some other MRSA isolates resistant to its effects [14,22]. Therefore, it is relevant to evaluate the susceptibility of resistant microorganisms to PDT in order to determine whether it can be used in the treatment of infections in which the prevalence of these microorganisms has increased at alarming rates.

In the same way, it is important to investigate the potential toxic effects of PDT to the host's cells, which are also susceptible to the action of ROS. In the present study, the metabolism of cultured fibroblast cells decreased by 68.1, 75.1 and 80% in response to exposure to curcumin at 5, 10 and 20 μM concentrations, respectively, in combination with blue LED light illumination. Similarly, in a previous study, porphyrin-mediated photodynamic therapy reduced the viability of human dermal fibroblasts by 66.5% and caused photodynamic inactivation of 99.9% of MRSA [14]. Even considering that the reduction of cell metabolism was accentuated in our study, it was not sufficient to cause complete inhibition of the SDH enzyme, suggesting that both MSSA and MRSA strains were more susceptible to PDT than the L929 fibroblasts. Dovigo et al. [24] obtained similar results when the same parameters used for fungal cells were applied for macrophage cell culture. While a complete photokilling was achieved for *C. albicans* planktonic cells, the macrophages metabolism was not completely reduced. Despite the significant reduction of cell metabolism, the *in vitro* experiments cannot reproduce all *in vivo* conditions. In a

living organism, in response to the oxidative stress generated by the presence of ROS, the defense the system releases several endogenous antioxidant agents, such as peroxidases and catalases, which promotes an enzymatic degradation of those highly reactive and unstable molecules to avoid excessive tissue damage [25].

The interaction of curcumin with biomolecules and cells has been investigated. Results of recent studies have indicated that curcumin binds preferentially to lipid membrane and some cell proteins [18]. Bruzell et al. [26] observed that PDT using curcumin at 13.5 μM in combination with halogen light illumination (6 J/cm^2) resulted in around 80% of necrotic cell death and less the 20% of apoptotic cell death. In the present study, the SEM analysis revealed that the fibroblast cell cultures subjected to PDT exhibited a significant decrease in the number of cells adhered to the glass substrate. In addition, several cytoplasmic rests remained adhered to the glass coverslip, indicating rupture of the cytoplasmic membrane and suggesting necrotic cell death.

Another factor to be considered for the use of curcumin as a PS is the vehicle used to deliver this compound. As curcumin is relatively insoluble in water, various diluents like acetone, DMSO and ethanol as well as other preparations such as micelles, cyclodextrine, liposomes and hydrophilic polymers have been proposed as vehicles for curcumin [26]. DMSO is the most commonly used vehicle to evaluate the phototoxic effects of PDT in *in vitro* studies and it has become a control to evaluate several types of drug vehicles because of its excellent solvent propriety [15,20]. In the present study, dilution of curcumin in DMSO increased its solubility in aqueous solutions, improving its bioavailability and promoting bacterial photokilling [27]. Bruzell et al. [26] reported that the use of curcumin at 13.5 μM diluted in DMSO was sufficient to reduce by 80% the viability of rat submandibular salivary gland acinar cells. However, preparation of the same curcumin concentration in cyclodextrine or liposome did not cause reduction of enzymatic activity. It is known that DMSO is not an optimal vehicle for *in vivo* applications because it increases membrane permeability to the drugs and may cause tissue damage and systemic effects [20]. Therefore, further studies should evaluate different vehicles as efficient as DMSO for curcumin to exert photokilling against bacterial strains.

Both essential components of PDT - the PS and the visible light - can alter cell functions. However, in the present study, no significant differences were observed between the groups exposed only to curcumin (C+L-) or blue LED light (C-L+) when

compared with the negative control (C-L-). Without illumination, the curcumin concentrations were insufficient to cause toxic effects against the bacteria and the fibroblast cultures. As mentioned before, micromolar concentrations caused cell damage only when used in combination with visible light because of ROS formation. In a similar way, no significant alteration in colony numbers of MSSA and MRSA or in the metabolism of fibroblast cells was detected after the use of LED light without previous photosensitization with curcumin. The results of the present investigations are in agreement with those of Ribeiro et al. [13] who did not find significant reduction on the metabolism of L929 fibroblasts and MDPC-23 cells using the same light source (blue LED) at similar light fluence (37.5 J/cm^2).

The results of the present study showed the efficiency of curcumin combined with blue LED light in causing photoinactivation of MSSA and MRSA. This therapy also caused a significant reduction of L929 cell metabolism, but was more effective in inactivating the bacterial samples than the fibroblast cell. The planktonic cultures used in this study represent the first step for evaluation of a light-sensitive compound in PDT. In the same way, cell cultures are more susceptible to the photocytotoxic effects of this therapy because they do not present the defense systems existing in a living organism. Therefore, further *in vitro* studies using biofilms and three-dimensional cultures as well as *in vivo* investigations are necessary to confirm the potential of curcumin as a PS as well as its clinical application on PDT.

Conclusion

This article demonstrated the efficiency of curcumin in combination with LED in promote photodynamic inactivation of MRSA. Although a significant reduction around 80% on fibroblast metabolism were also observed, this therapy caused photodynamic inactivation of 100% of MRSA showing that PDT was more efficient against bacteria. Therefore, the results obtained encourage the continued evaluation of PDT protocols using natural compounds to eradicate pathogenic bacteria such as MRSA in institutions and hospitals in which these bacteria are responsible for significantly higher morbidity and mortality and increased healthcare costs.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Center of Study in Optics and Photonics (CEPOF) and the Physics Institute of São Carlos (IFSC) of the University of

São Paulo (USP) for developing the LED prototype used in this study. This work was supported by FAPESP - São Paulo Research Foundation (Grants 2008/03994-9 and 2010/05425-1).

References

1. Sumi Y, Miura H, Michiwaki Y, Nagaosa S, Nagaya M (2007) Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 44:119-124.
2. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J (2001) The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol* 50:940-946.
3. Terpenning M (2005) Geriatric oral health and pneumonia risk. *Clin Infect Dis* 40:1807-1810.
4. Rossi T, Peltonen R, Laine J, Eerola E, Vuopio-Varkila J, Kotilainen P (1996) Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. *J Hosp Infect* 34:311-320.
5. Buehlmann M, Frei R, Fenner L, Dangel M, Fluckiger U, Widmer AF (2008) Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:510-516.
6. Maeda Y, Kenny F, Coulter WA, Loughrey A, Nagano Y, Goldsmith CE, et al (2007) Bactericidal activity of denture-cleaning formulations against planktonic health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Infect Control* 35:619-622.
7. Simor AE, Phillips E, McGeer A, Konvalinka A, Loeb M, Devlin HR et al (2007) Randomized controlled trial of chlorhexidine gluconate for washing, intranasal mupirocin, and rifampin and doxycycline versus no treatment for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Clin Infect Dis* 44:178-185.
8. Loveday HP, Pellowe CM, Jones SR, Pratt RJ (2006) A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (Subgroup A). *J Hosp Infect* 63 Suppl 1:S45-70.
9. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM (2008) Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 163:1-12.
 10. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K (2010) Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci* 9:365-369.
 11. Konopka K, Goslinski T (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86:694-707.
 12. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS (2011) Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses* 54:123-130.
 13. Ribeiro AP, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS, de Souza Costa CA (2010) Photodynamic therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. *Cell Biol Int* 34:343-351.
 14. Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP (2008) Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B* 90:57-63.
 15. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT (2010) Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr* 103:1545-1557.
 16. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV et al (2009) Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother* 63:337-339.
 17. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS (1989) Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol* 151:183-185.

18. Priyadarsini KI (2009) Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry* 10:81-95.
19. Wang Y, Lu Z, Wu H, Lv F (2009) Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 136:71-74.
20. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH (2009) Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie* 64:666-673.
21. Shen L, Jia HF, Zhang HY (2005) A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photosensitizing mechanisms of the pigment. *Chemical Physics Letters* 409: 300–303.
22. Tsai T, Yang YT, Wang TH, Chien HF, Chen CT (2009) Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg Med* 41:316-322.
23. Szpakowska M, Lasocki K, Grzybowski J, Graczyk A (2001) Photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut(2)-Arg(2)) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacol Res* 44:243-246.
24. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C (2011) Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 87:895-903.
25. Esposito P, Varvara G, Caputi S, Perinetti G (2003) Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. *Int Endod J* 36:599-603.
26. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH (2005) Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci* 4:523-530.

27. Kurien BT, Scofield RH (2009) Heat-solubilized curcumin should be considered in clinical trials for increasing bioavailability. Clin Cancer Res 15:747.

Tables

Table 1- Mean values and standard deviation of log (CFU/mL) calculated from the results of MSSA evaluation. Different lowercase letters denote significant differences among columns while different uppercase letters denote significant differences among rows, according to Tukey's Test ($p < 0.05$).

Light Fluences (J/cm ²)	Curcumin Concentrations (μM)						
	0	0.1	0.5	1	5	10	20
0	6.76 ^{A a}	6.73 ^{A a}	6.79 ^{A a}	6.76 ^{A a}	0.00 [*]	0.00 [*]	0.00 [*]
	0.04	0.03	0.06	0.04	0.00	0.00	0.00
18	6.76 ^{A a}	5.68 ^{B b}	4.32 ^{B c}	2.35 ^{B d}	0.00 [*]	0.00 [*]	0.00 [*]
	0.05	0.05	0.04	0.12	0.00	0.00	0.00
25.5	6.75 ^{A a}	4.67 ^{C b}	4.16 ^{C c}	1.69 ^{C d}	0.00 [*]	0.00 [*]	0.00 [*]
	0.03	0.28	0.08	0.27	0.00	0.00	0.00
37.5	6.78 ^{A a}	4.51 ^{C b}	4.14 ^{C c}	1.88 ^{C d}	0.00 [*]	0.00 [*]	0.00 [*]
	0.05	0.03	0.03	0.34	0.00	0.00	0.00

*: Complete inactivation was observed

Figures:

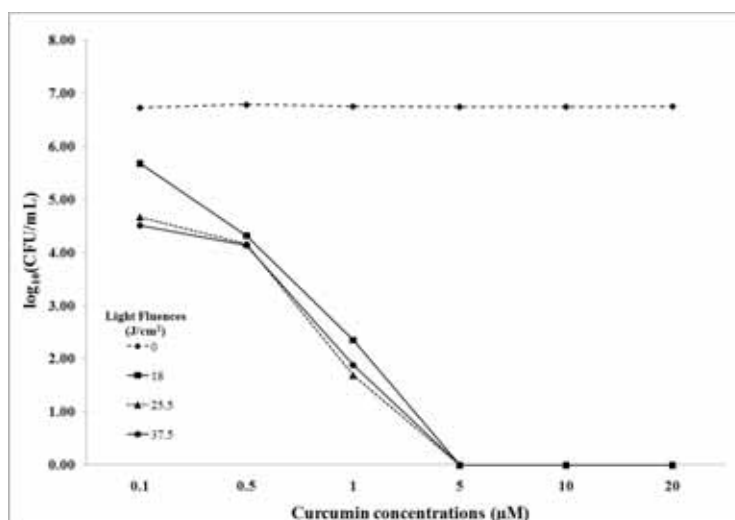


Figure 1: Effect of curcumin concentrations on MSSA cell survival (CFU/mL) at different light fluences. MSSA suspensions were incubated for 20 minutes with curcumin concentrations ranging from 0.1 to 20 µM and then irradiated with blue LED at three different light fluences (18, 25.5 and 37.5 J/cm²). Data are expressed as mean values of three independent experiments (n=3).

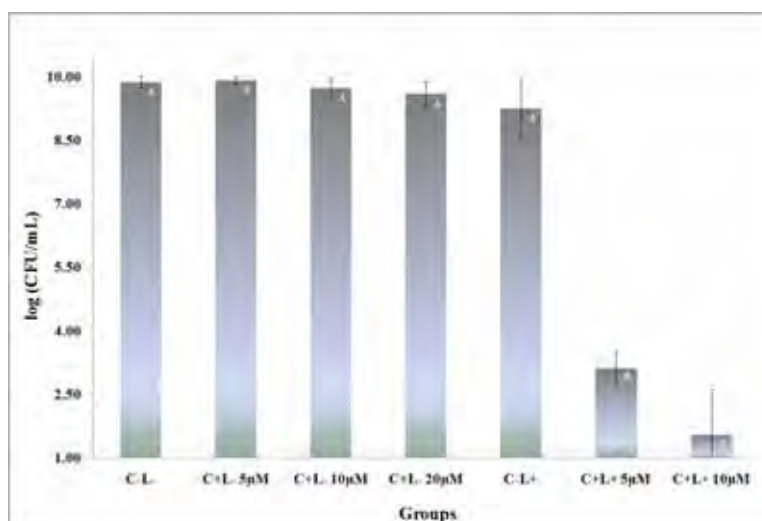


Figure 2: Graphic representation of mean values and standard deviation of survival counts (CFU/mL) observed after experiments with MRSA. The light fluence used was 37.5 J/cm² (groups C-L+ and C+L+). Different uppercase letters denote significant differences among columns (groups) according to Tukey's Test ($p < 0.05$).

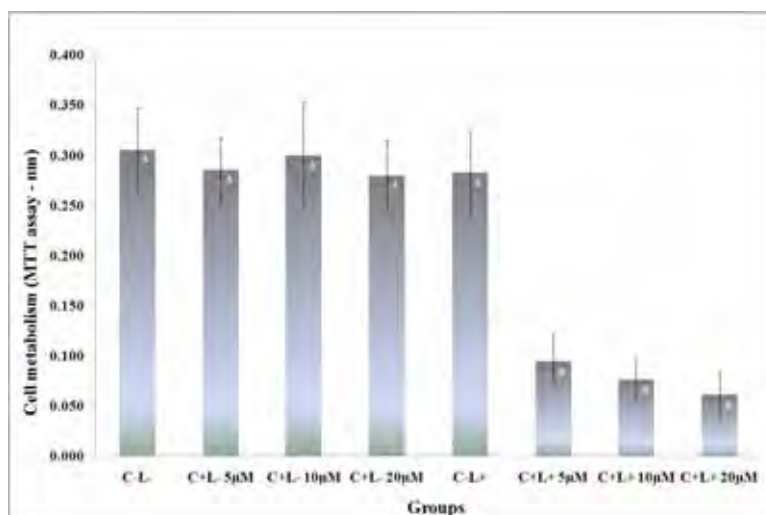


Figure 3: Graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (MTT assay) observed after experiments with L929 fibroblast. The light fluence used was 37.5 J/cm^2 (groups C-L+ and C+L+). Different uppercase letters denote significant differences among columns (groups) according to Tukey's Test ($p < 0.05$).

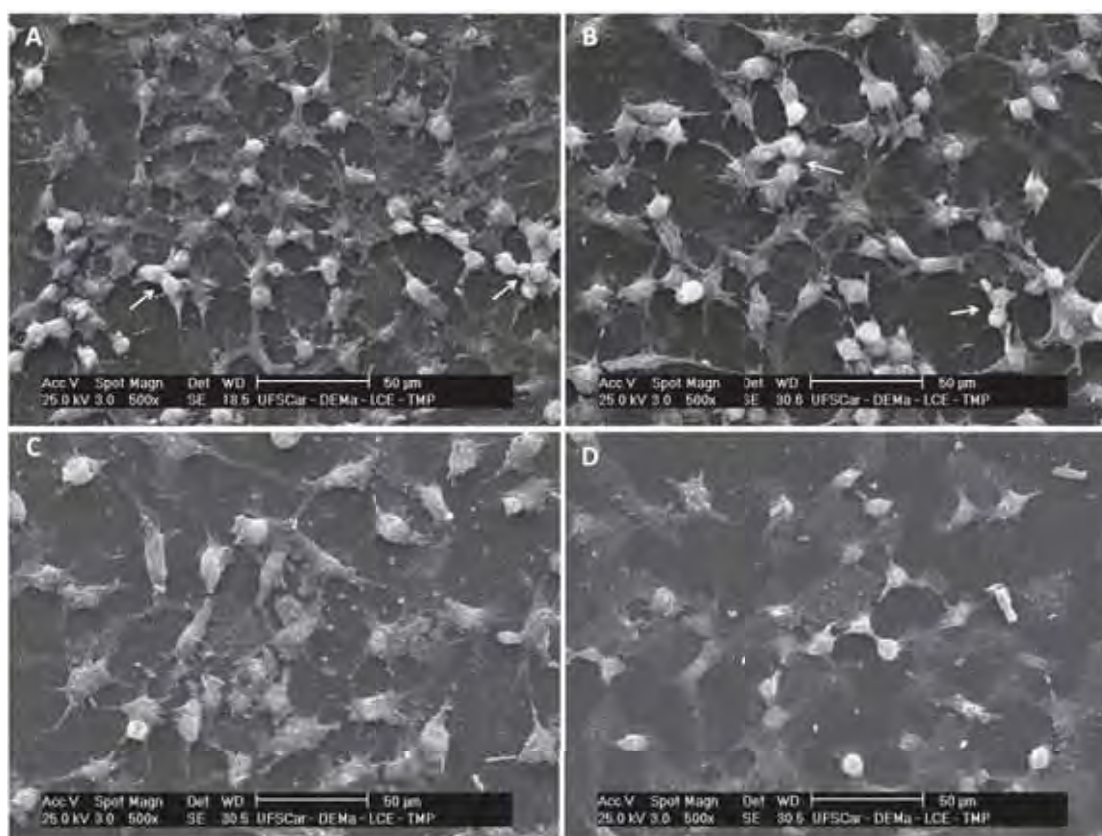


Figure 4: Representative SEM micrographs, SEM, 500X. A- Negative control group of L929 fibroblasts (C-L-); B- L929 fibroblasts in contact with curcumin at $20\mu\text{M}$

(C+L- 20 μ M); C- L929 cell line exposed to PDT with 5 μ M of curcumin; D- L929 cell line exposed to PDT with 20 μ M of curcumin.

3.2 *Capítulo 2*

Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions

Ana Paula Dias Ribeiro¹, Ana Cláudia Pavarina^{1*}, Mariana Carvalho Andrade¹,
Julhiany de Fátima da Silva², Janaina Habib Jorge¹, Fernando Lucas Primo³,
Antônio Cláudio Tedesco³

¹Department of Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, SP, 14801-903, Brazil.

² Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, 14801-903, Brazil.

³Center of Nanotechnology and Tissue Engineers, Photobiology and Photomedicine research Group, FFCLRP- São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil.

†**Corresponding author** : Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Rua Humaitá, 1680, CEP 14801-903, São Paulo, Brasil.
Phone: +55-016-3301-6410. Fax: +55-016-3301-6406. E-mail: pavarina@foar.unesp.br

* Artigo submetido e em revisão pelo periódico “Photochemistry and Photobiology”.

Abstract:

New drug delivery systems, such as nanoemulsions (NE), have been developed to allow the use of hydrophobic drugs on the antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). This study evaluated the photodynamic potential of aluminum-chloride-phthalocyanine (CIAIPc) entrapped in cationic and anionic NE to inactivate *C. albicans* planktonic and biofilm cultures compared with free CIAIPc. Fungal suspensions were treated with different delivery systems containing CIAIPc and illuminated with LED. For planktonic suspensions, colonies were counted and cell metabolism was evaluated by XTT assay. Flow cytometry evaluated cell membrane damage. For biofilms, the metabolic activity was evaluated by XTT reduction assay and CIAIPc distribution through biofilms three-dimensional architecture was analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Fungal viability was dependent on the delivery system, superficial charge and light dose. Free CIAIPc caused photokilling of the yeast when combined with a higher light dose. Cationic NE-CIAIPc reduced significantly both CFU/mL and cell metabolism compared with the negative control ($p < 0.05$). In addition, cationic NE-CIAIPc and free-CIAIPc caused significant damage to the cell membrane ($p < 0.05$). For the biofilms, cationic NE-CIAIPc reduced cell metabolism by 70%. Anionic NE-CIAIPc did not present antifungal activity. CLSM showed different accumulation and fluorescence intensities emissions on biofilm structure for the evaluated delivery systems.

Key Words: Antimicrobial Photodynamic Therapy, *C. albicans* biofilms, Confocal Laser Microscopy, Drug delivery systems, phthalocyanine.

Introduction

Candida albicans is a commensal microorganism commonly found in the oral cavity of healthy individuals. However, under certain conditions, this yeast has the capacity to alter its morphology, acting as an opportunistic pathogen, invading tissues and starting infectious processes (1). Oral and oropharyngeal candidosis are considered the most frequent fungal infections in humans, developing after the increase of *Candida* spp. colonization and subsequent infection of oral and oropharyngeal tissues and affecting mainly immunocompromised patients (1). Local etiological factors such as reduction of salivary flow rate, local trauma, pH changes and use of dental prostheses could also be associated with the development of these oral infections (2).

Currently available treatments for oral and oropharyngeal candidosis are based on the administration of topical and systemic antifungal drugs. Topical antifungal medications, such as nystatin and miconazole, are usually applied in the first episodes of candidosis (3), and the results of infection remission are temporary in most cases. Systemic antifungal medications, such as fluconazole, itraconazole and amphotericin B, are usually prescribed to individuals with compromised general health and those with recurrent infection episodes (4). However, these drugs should be prescribed with caution due to the possibility of hepatotoxic and nephrotoxic effects (5). The development of strains resistant to antifungal drugs, especially fluconazole, and the limited number of drugs available for antifungal therapy are additional shortcomings (6). Therefore, the treatment of fungal infections in immunocompromised individuals is frequently a difficult task.

In this way, alternative or adjuvant treatments have been explored in order to limit the adverse effects of these infections. The antimicrobial photodynamic therapy

(aPDT) has emerged as one of the possibilities, using a non-toxic light-sensitive compound (known as photosensitizer - PS) in combination with a visible light source of appropriate wavelength with maximum absorption by the PS. This therapy comprises three phases: PS excitation, production of reactive oxygen species (ROS) and cell death (7). In the first phase, the light source transfers energy to the light-sensitive drug, whose molecules absorb this energy and pass to an excited singlet state. From this stage, the PS molecules pass to an excited triplet state transferring the absorbed energy to the oxygen molecules (type II reaction) or to other molecules that will react with oxygen (type I reaction) (8).

The principle of aPDT presupposes that PS can bind and penetrate fungal cells more rapidly than host cells. Therefore, irradiation of the infected area after application of a light-sensitive drug ultimately cause destruction of microbial cells without causing damage to the subjacent normal cells (9). The advantages of aPDT, such as its antimicrobial action, are related to its instantaneous fungicidal effect and the possibility of several PDT applications without inducing microbial resistance to this therapy (10). This latter characteristic is attributed to the mechanism of action of aPDT based on production of singlet oxygen and other ROS. These free radicals interact with several cell components (proteins, membranes lipid and nucleic acids) by different mechanisms, reducing the chances of development of aPDT-resistant strains (11).

Some light-sensitive drugs have been evaluated for use in aPDT, among which the phthalocyanines are noteworthy. These second-generation PSs have a more effective production of singlet oxygen, with higher oxidative power compared with hematoporphyrin- and phenothiazine-derivatives (12,13). In spite of these advantages, these compounds are highly hydrophobic, which impairs their circulation in aqueous

medium and increases the possibility of aggregate formation, reducing the photodynamic efficiency (14). Therefore, new drug delivery systems with hydrophobic compartments for solubilization of phthalocyanines have been developed, such as polymeric micelles, liposomes, nanoparticles and nanoemulsions (NE) (14-17). Among these drug delivery systems, NE represents an option for topical application (18) and can be used in the treatment of superficial fungal infections. This type of phthalocyanine entrapment has been evaluated for its antitumor potential and for the treatment of infections caused by periodontal pathogens (13,14,19). However, there are no published studies reporting on the use of NE in planktonic and biofilm cultures of *C. albicans*. Therefore, drug delivery systems at the nanoscale and with different charges represent an option for permeation of biofilms and killing of microorganisms. The aim of this study was to evaluate the photodynamic effect of chloro-aluminum-phthalocyanine (ClAlPc) entrapped in cationic and anionic NE compared with ClAlPc diluted in organic solvent (free ClAlPc) on the inactivation of *C. albicans* planktonic and biofilm cultures. The viability of the *C. albicans* cells suspended in planktonic cultures was determined by the XTT assay and by counting colony forming units *per* milliliter (CFU/mL). For the *C. albicans* cells organized as biofilms, viability was assessed by the XTT assay and ClAlPc distribution in biofilms was examined by confocal laser-scanning microscopy study of the biofilms. In addition, the occurrence of possible damage to the *C. albicans* cell membrane was determined using the propidium iodide (PI) flow cytometry assay.

Material And Methods

Photosensitizer and synthesis

CIAIPc was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and the natural soy phospholipids Epikuron 170 (7.5%) and Miglyol 812 N oil (250 μ L) were obtained from Hulls Inc. (Puteaux, France). The NE was obtained by spontaneous emulsification as previously described (14). Initially, the surfactants were dissolved in 10 mL of spectroscopic acetone at 55 °C under magnetic stirring. At the same time, the phthalocyanine was dissolved directly in Miglyol 812 N oil at 55 °C and was added to the phospholipid organic solution at a concentration of 1.0 mg/mL. The aqueous phase was obtained by dissolution of the biopolymer Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in ultra-pure water. The NE was formed by slow injection of the organic phase into the aqueous phase under magnetic stirring (300 rpm for 30 min) at 55°C. The solvent was then evaporated under reduced pressure at approximately 75°C, and the volume of the NE was concentrated to the initial volume of the aqueous phase. The amount of hydrophilic and lipophilic surfactants was fixed at 1% with a 1:1 weight ratio. The photophysical, chemical and biological properties were evaluated and exhibited similar response as observed in previous studies of the research group (13,14). The final concentration of CIAIPc in the NE was 31.8 μ M and two NE with superficial charges were developed, namely a cationic NE and anionic NE. In order to compare the photodynamic inactivation of *C. albicans* by this new delivery system (NE-CIAIPc, in its cationic and anionic forms) and by free CIAIPc, the drug was also diluted in DMSO. A stock solution of phthalocyanine (600 μ M) was prepared in DMSO and then diluted in PBS to obtain the same final concentrations of NE (31.8 μ M).

Yeast strain and preparation of cultures

The microorganism used in this study was an American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) strain of *C. albicans* (ATCC 90028) maintained in solid Yeast-Peptide-Glucose medium and frozen at -70°C . To obtain the standardized *C. albicans* planktonic suspensions, the yeast was individually inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB), incubated for 18 hours at 37°C . Cells in the logarithmic phase of growth were harvested by centrifugation (5000 rpm for 7 min), washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). The cell suspensions were standardized with a spectrophotometer (Biospectro, Equipar Ltda., Curitiba, PR, Brazil; model: SP-220) calibrated at 520 nm wavelength to give final concentration of 1×10^7 cells mL^{-1} .

Photoinactivation of planktonic cultures

Aliquots of 150 μL of the standardized *C. albicans* planktonic suspensions were individually transferred to separate Eppendorf flasks and centrifuged to remove the supernatant. The cells were incubated with the NE (cationic and anionic) containing the CIAIPC or the free CIAIPc for 30 min in the dark. After this period, the phthalocyanine was washed out and 300 μL of PBS were added to the cells. The samples were transferred to a 24-well plate that was placed on a light device for irradiation. A light emitting diode (LED)-based device, composed of red LEDs (LXHL- PR09, Luxeon III Emitter; Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA), was used to excite the phthalocyanine. The LED device provided a maximum emission at 660 nm and the irradiance delivered was of $38.1 \text{ mW}/\text{cm}^2$. The light doses used in this study were 50 and $100 \text{ J}/\text{cm}^2$. The groups subjected to PDT were called PDT groups and were defined by the type of delivery system used. Table 1 presents the groups distribution.

To determine whether CIAIPc alone and its delivery systems induced any effect on yeast viability (dark toxicity controls), additional wells containing *C. albicans* planktonic suspensions were exposed to the drug under identical conditions to those described above, but not to LED. Another group was exposed only to LED irradiation to evaluate the effects of light alone (light control). The overall control (negative control) consisted of *C. albicans* planktonic suspensions not exposed to CIAIPc or LED.

Determination of cell survival in planktonic cultures

Cell survival in planktonic cultures was determined by the number of colony forming units per milliliter (CFU/mL) and by the XTT assay, a metabolic assay based on the reduction of a tetrazolium salt (XTT, Sigma-Aldrich). For the CFU method, 10-fold serial dilutions of aliquots of the contents of each well were prepared using sterile saline. Duplicate 25 μ L aliquots were plated onto Sabouraud Dextrose agar (SDA) medium containing 5 mg/L gentamicin. All plates were aerobically incubated at 37°C for 48 hours and thereafter, colony counts of each plate were quantified using a digital colony counter (CP 600 Plus; Phoenix Ind. Com. Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brazil) and the CFU/mL was determined (20).

For the XTT assay, the salt was dissolved in PBS (1 mg/mL) and stored at -70°C. For each experiment, 158 μ L of PBS was prepared with glucose at 200 mM, 40 μ L of XTT plus 2 μ L of menadione at 0.4 mM (Sigma-Aldrich) were mixed and transferred to each well. The plates were incubated in the dark at 37°C for 3 h. After this 100 μ L of the reacted XTT salt solution was transferred to a 96-well plate and the cell viability was analyzed by proportional colorimetric changes and light absorbance measured by a microtiter plate reader (Thermo Plate - TP Reader) at 492 nm.

Estimation of membrane damage by flow cytometry

Yeast suspensions were incubated with the cationic and anionic NE-CIAIPc and free CIAIPc for 30 min and irradiated after the washed out procedure as described above. After the aPDT protocol, the cells were centrifuged to remove the supernatant and resuspended in 1 mL of ligation buffer containing 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂. The cells were stained and analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) in a flow cytometer (FACSCanto; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with argon laser and BD-FACS Diva software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). At least 10,000 events were collected for each sample. An aliquot of 3 μ L PI (1 μ g/mL) was added to the cell suspensions immediately before measuring the fluorescence. This dye has a high affinity towards nucleic acids and only penetrates cells with damaged cytoplasmic membranes.

Biofilm formation and aPDT of biofilms

Colonies of recently grown yeast isolates on SDA were transferred to a Falcon tube containing RPMI 1640 and incubated overnight in an orbital shaker (AP 56, Phoenix Ind. Com. Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil) at 120 rpm and 37°C. Cultures were centrifuged, and the supernatants discarded. The cells were washed twice and, finally, resuspended in PBS. Standardized cell suspensions were obtained as described for the planktonic cultures. The resulting standardized suspensions were standpoint for every further procedure. Aliquots of 100 μ L of standardized *C. albicans* suspensions were transferred to a 96-wells microtiter plate and incubated for 90 min at 37°C in the orbital shaker at 75 rpm for the adhesion

phase. After this period, each well was washed twice with PBS and 150 μL of freshly prepared RPMI 1640 was added to each well. The plates were incubated for 48 hours at 37°C in order to generate single-species biofilms. This protocol has been described previously (20).

After this period, the wells were carefully washed twice with 200 μL of PBS to remove non-adherent cells. Aliquots of 150 μL of NE-entrapped CIAIPc or free CIAIPc were added to each appropriate well directly over the biofilm. The photosensitizers were left in contact with the biofilms for 30 min and then were washed out. Aliquots of 150 μL of PBS were added to the wells and the biofilms were illuminated using light doses of 50 and 100 J/cm^2 . The same experimental conditions described previously for planktonic cultures were performed in biofilms and the treatments received the same groups description (Table 1). The photodynamic effects against the biofilms were also evaluated by the XTT assay (20).

Confocal laser-scanning microscopy study of biofilms

C. albicans biofilms were developed on 8-mm round coverslips and incubated for 48 hours at 37°C , as described previously. The biofilms were washed and incubated with the cationic and anionic NE-CIAIPc and free CIAIPc for 30 minutes. They were then covered with coverslips and examined by a Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Serial sections of biofilms in the xy plane were obtained at 1- μm intervals along the z axis and scanned by the transmission mode using 635 nm laser radiations. The red fluorescence of CIAIPc bound to *C. albicans* biofilms was observed at 635 nm excitation wavelength and fluorescence emission from 660 to 740 nm, allowing the examination of the stained biofilm cells.

Statistical analysis

For the purpose of analysis, CFU/mL values were transformed into logarithm (\log_{10}). The results collected after the evaluation of aPDT against planktonic suspensions (log CFU/mL and XTT absorbance), biofilm cultures (XTT absorbance) and membrane damage (fluorescence) presented heterocedasticity. The Kruskal-Wallis and Multiple Comparison based on pairwise ranking test were used to detect differences in CFU/mL and XTT absorbance values among investigated groups. For flow-cytometry data, one-way ANOVA was used. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

aPDT on C. albicans planktonic cultures

The effect aPDT of CIAIPc entrapped in cationic and anionic NE and free CIAIPc against *C. albicans* suspension (10^7 CFU/mL) was investigated (Fig. 1). The viability of fungal cells after aPDT was dependent on the delivery system used (NE or free), superficial charge of the NE (cationic or anionic) and light dose (50 or 100 J/cm²). Free CIAIPc promoted photokilling of the yeast when irradiated using the light dose of 100 J/cm², being the only combination that resulted on total eradication of this microorganism ($p < 0.05$). Cationic NE-CIAIPc caused a ~ 1.5 and $\sim 3.1 \log_{10}$ reduction of cell survival when combined with light doses of 50 and 100 J/cm², respectively. Anionic NE-CIAIPc showed less than $\sim 0.5 \log_{10}$ reduction on CFU/mL with both light doses, showing that this system was not effective against *C. albicans*. Control experiments showed that the *C. albicans* CFU/mL was unaffected by the presence of both types of NE containing the CIAIPc for 30 min. The results indicate

clearly that the cell mortality obtained after irradiation of the suspensions was induced by the photosensitization activity of phthalocyanine.

Regarding the analysis by the XTT assay, the cell metabolism reduction was also dependent on the delivery system used and the superficial charge of the NE (Fig. 2). In all the tested systems, illumination of CIAIPc with LED caused a higher reduction on cell metabolism achieving approximately 99.5% when the free CIAIPc was combined with illumination at 100 J/cm². The anionic NE-CIAIPc associated to both light doses caused reduction similar to that of the cationic NE-CIAIPc dark control, indicating that this delivery system had less effect on fungal metabolism. On the other hand, the cationic NE-CIAIPc used in combination with a light dose of 50 and 100 J/cm² showed greater reduction, around 93.1 and 92.3%, respectively, when considering the negative control (NC) as 100% of cell metabolism. The use of a higher light dose did not result in greater reduction of *C. albicans* metabolism, differently from the colony count assay. The greatest decrease was observed for the free CIAIPc, approximately 96.6 and 99.5% when combined with 50 and 100 J/cm² light fluences, respectively. The results also showed that the CIAIPc entrapped in the cationic NE-CIAIPc and the free CIAIPc had potential to cause a decrease in cell metabolism in dark conditions ($p < 0.05$), although no reduction in cell survival was observed for these groups (Fig. 1).

Cell membrane damage assay

Flow cytometry assay using PI fluorochrome was used to study the mechanism by which the CIAIPc entrapped or not in NE is able to promote inhibition of *C. albicans* growth after irradiation. This fluorescent molecule is membrane impermeant and generally excluded from viable cells. Thus, it allows identifying cells

with damaged cytoplasmic membrane. Regarding the dark controls of the NE-CIAIPc and free CIAIPc, the cationic NE showed approximately 6 times more fluorescence than the negative control ($p < 0.05$), which suggest that this delivery system can cause damage to cytoplasmic membrane when applied alone. The results clearly demonstrate that the combination of all the tested systems with light induces higher levels of membrane damage, depending directly on the light dose used (Fig. 3). Illumination of free CIAIPc and cationic NE with a light fluence of 100 J/cm^2 increased the percentage of PI-positive cells up to 34 and 49% when compared to negative control group (approximately 2%).

aPDT on C. albicans biofilms

The biofilms of *C. albicans* developed after 48 hours were treated with CIAIPc ($31.8 \text{ } \mu\text{M}$) for an incubation period of 30 min. The same light regimen as for suspension (660 nm LED , 50 and 100 J/cm^2) was used. In the same way as observed for the planktonic cultures, the values obtained from the XTT assay of biofilms were dependent on the type of carrier, type of superficial charge in the NE and light dose (Fig. 4). The cationic NE-CIAIPc presented a significant dark toxicity for the biofilms resulting in significant reduction of the absorbance values for this group ($p < 0.05$). Differently, no dark toxicity was observed for free CIAIPc or anionic NE-CIAIPc. Although the cationic NE present a significant dark toxicity for biofilms, its efficiency in causing decrease in *C. albicans* metabolism was greater when combined with light, reaching a reduction of approximately 70% when used with 100 J/cm^2 . For the biofilms, the free CIAIPc presented an intermediate behavior. When illuminated with both 50 and 100 J/cm^2 fluences, the free CIAIPc decreased the biofilm metabolism by approximately 26 and 34%, respectively. The anionic NE-CIAIPc induced an increase

on cell metabolism of about 21% when compared to the negative control, which was also maintained when combining the anionic NE-CIAIPc with a light dose of 50 J/cm². When the higher light dose was used (100 J/cm²), there was a 5% reduction on biofilm metabolism, though without significant difference from the negative control (p>0.05). The results demonstrate that the higher light dose caused great reduction in yeast biofilm metabolism for all the tested delivery systems.

Confocal Laser Scanning Microscopy Observations:

The accumulation of free CIAIPc, anionic and cationic NE-CIAIPc into fungal biofilms as observed by CLSM is presented in Figures 5, 6 and 7, respectively. The red fluorescence detection of free CIAIPc into *Candida* cells suggests that CIAIPc diluted in DMSO presented a diffuse accumulation from the cellular wall to some extent inside the cells (Fig. 5A). Also, the side views of the same biofilm (Fig. 5B) revealed lack of sensitized cells in the deepest portions (yellow arrows), whereas the outermost layers clearly showed higher fluorescence (white arrows). Figure 5C shows the overlay of fluorescence of free CIAIPc with the light transmission mode indicating that CIAIPc diluted in DMSO had a tendency to accumulate into hyphae. For the anionic NE-CIAIPc, bright fluorescence could be seen on the three-dimensional view, accumulating preferentially in the extracellular matrix (Fig. 6A), while no fluorescence emission was observed inside hyphal and yeast forms. The side views reveal that this delivery system was able to penetrate deeply into the biofilm structure showing a great fluorescence in the deepest portions (white arrows) (Fig. 6B). The overlay image shows that the anionic NE-CIAIPC had a limited accumulation into the *C. albicans* cells (Fig. 6C). The cationic NE-CIAIPc showed a diffuse accumulation preferentially in extracellular matrix and cellular wall from hyphae and yeast (Fig.

7A). As observed for the free CIAIPc, the side views showed lack of sensitized cells in the deepest portions (yellow arrows) and higher fluorescence on the outermost layers (white arrows) (Fig. 7B). The merge of the transmission mode and fluorescence was applied to visualize dye uptake into the biofilm structure (Fig. 7C).

Discussion

The photodynamic efficacy of CIAIPc in antitumor aPDT has been demonstrated with excellent results on decreasing the toxicity of tumor cells and promoting tumor regression in vivo (21-23). This PS has high photodynamic activity and is easy to synthesize and commercially available (24). Therefore, it appears as an option for use in aPDT, with better properties than those of porphyrins and phenothiazines. Little research has been done on the use of CIAIPc in aPDT, and the available studies investigated its effect on the inactivation of cariogenic bacteria (17) and progression of periodontal disease (13). Fungal photokilling by phthalocyanine has been described by Mantareva et al. (25-27) using phthalocyanines directly diluted in aqueous solution. In the search for more stable delivery systems for light-sensitive drugs, the present study investigated the antifungal photodynamic effect of NE-entrapped CIAIPc on planktonic and biofilm cultures of *C. albicans*.

CIAIPc entrapped in NE has a high tissue penetration capacity (14, 19) and may be used in aPDT protocols to treat superficial mucosa and skin lesions. This type of delivery system offers better availability of the drug, reducing the possibility of aggregation and loss of photodynamic efficiency and increasing the stability of the PS (28). In general, most aPDT studies have used PS in aqueous solutions either diluted directly in buffering solutions or initially dissolved in an organic solvent, such as DMSO, and then diluted in aqueous medium (29). Although this is a viable procedure

for in vitro experiments, the clinical application of the drugs is difficult because the media are instable, which requires preparation of the light-sensitive drug at the moment of application to ensure minimal alterations of its physical properties. The NE used in the present study permits the maintenance of the photosensitizing properties of CIAIPc for up to weeks (14) and has greater viscosity, which favors the clinical application.

The results of the present study demonstrated that aPDT with CIAIPc was effective on decreasing the viability of *C. albicans* planktonic and biofilm cultures. This decrease was dependent on the drug delivery system, superficial charge and light dose. For the planktonic suspensions, free CIAIPc presented the best results on the decrease of both CFU/mL counts and cell metabolism (XTT assay). The combination of free CIAIPc at 31.8 μM and LED light dose of 100 J/cm^2 resulted in photokilling of *C. albicans* cells and 99.5% reduction of its metabolism (XTT assay). Mantareva et al. (26) also observed photodynamic inactivation of all *C. albicans* cells when silicon-phthalocyanine was used in combination with LED, while germanium-phthalocyanine caused only 1 \log_{10} -unit reduction in fungal growth. It is therefore important to consider the metallic group when evaluating the photodynamic potential of phthalocyanine because it is responsible for the phototoxicity potential and ionic characteristics of the drug (21).

Even though the NE-CIAIPc did promote complete photoinactivation of the planktonic suspensions, the cationic NE-CIAIPc promoted a 3 \log_{10} -unit reduction in viable fungal counts, while the anionic NE-CIAIPc did not promote of a significant reduction in the number of CFU/mL. In addition, cationic NE-CIAIPc reduced cell metabolism by approximately 93.1 and 92.3% when combined with light doses of 50 and 100 J/cm^2 , respectively. This greater efficiency of cationic drugs has been

demonstrated in previous studies (25,30). Cormick et al., (30) evaluated the photodynamic action of cationic and anionic porphyrins against *C. albicans* suspensions and verified that the anionic porphyrin did not present any antimicrobial potential even after 3 hours of irradiation, as demonstrated by the low fluorescence within the *C. albicans* cells, which indicates the low affinity of this PS with the yeast. The cationic porphyrin, on the other hand, bound rapidly to *C. albicans*, reaching maximum concentration after 30 min of contact with the yeast, resulting in a 3 log₁₀-unit reduction in viable counts when activated by light. Another study evaluating the antimicrobial photodynamic potential of cationic and anionic zinc-phthalocyanines revealed that the anionic phthalocyanine combined with an argon-pumped dye laser system (light dose of 60 J/cm²) did not promote phototoxic damage to *C. albicans* suspensions, while the use of cationic phthalocyanine at a lower light dose resulted in complete photoinactivation (25). This greater affinity for PSs or even delivery systems of cationic nature results from their interaction with the external surface of the fungal cell wall, which has a negative residual charge (17). As the cell wall provides structure to fungal cell in addition to protection to the external environment, the drugs should be able to cross this barrier and reach the internal cell compartments in order to produce cell damage (30). Therefore, the superficial charge is extremely important for achieving effective outcomes in aPDT and the use NE permit this type of modification, which may produce better photodynamic effects.

In the planktonic cultures, the phototoxic action of the CIAIPc entrapped in cationic NE-CIAIPc resulted from the drug absorbed by the fungal cells. After the pre-incubation period, the excess of extracellular NE-CIAIPc was removed because the opaque characteristics of the emulsions made difficult their interaction with the light. Therefore, the antimicrobial photodynamic effect resulted from the CIAIPc present

within the fungal cells, which reinforces once more the fact that the cationic NE were capable of penetrating into the *C. albicans*, while the anionic NE presented low affinity with the yeast. Furthermore, this capacity of CIAIPc to bound to the fungal cells is important because it limits the phototoxic damage to the cells that absorbed this PS. Bertoloni et al. (31) reported that the photodynamic action of a porphyrin was reduced when it was removed from the extracellular medium, and its mechanism of action depends on an initial damage to the membrane to permit the penetration of the PS into the fungus. Therefore, from the obtained results, it may be suggested that the mechanism of action of CIAIPc does not depend on excess extracellular PS to cause external damage to the wall or membrane, as the phthalocyanine absorbed by the fungal cells was responsible for the cell damage.

In the present study, the CFU/mL data of cell suspensions were complemented by the XTT assay, which was performed immediately after aPDT allowing the evaluation of the initial effect of this therapy on the microorganisms. The absorbance values obtained from the XTT assay revealed that the metabolism of *C. albicans* cells decreased by approximately 93% after aPDT with cationic NE. However, colony count revealed a ~3.0 log reduction of cell survival. These results suggest that the products generated by the aPDT reaction using CIAIPc entrapped in cationic NE were capable of causing cell damage that resulted in reduction of the initial mitochondrial activity. Nevertheless, these damages were not sufficient to cause the death of all cells as growth of some colonies was observed after 48 hours in adequate culture medium such as SDA. Yet, these colonies presented smaller size when compared with the negative control, demonstrating that aPDT with cationic NE altered the process of cell replication and consequently the growth of *C. albicans* colonies.

In order to evaluate the possible effects of CIAIPc to the cytoplasmic membrane of *C. albicans* cells, planktonic cultures subjected to aPDT were analyzed by flow cytometry using PI fluorochrome, a nuclear marker that does not pass through the membranes of intact cells and can penetrate only permeable membranes of damaged cells. The results indicated that for all delivery systems, the combination of phthalocyanine with light increased the percentage of PI-positive cells. The group that was completely inactivated (free-CIAIPc combined with light dose of 100 J/cm²) presented the highest percentage of PI-positive cells. Giroldo et al. (32) also observed damage to the cytoplasmic membrane of fungi using the SYTOX[®] Green nucleic acid stain, which green-fluorescent nuclear and chromosome counterstain, and spectrofluorometry. Those authors verified a two-fold increase in the fluorescence of the group subjected to aPDT with methylene blue compared with the control, and reported a 50% reduction of CFU/mL counts under the same conditions. In the present study, while the percentage of PI-positive cells in the control group was approximately 2%, the percentage of these cells in the groups treated with cationic NE- CIAIPc and free-CIAIPc was 34 and 49%, respectively. Therefore, the results of flow cytometry demonstrated that the cytoplasmic membrane was target of the ROS produced by the aPDT reaction, confirming the best results for the groups of cationic NE- CIAIPc and free-CIAIPc, with larger number of PI-positive cells and more accentuated reduction of cell metabolism and colony counts.

The investigation of the antimicrobial effect of aPDT on biofilms is extremely important as this represents the most common form of microbial organization (33). In addition, because of their characteristics, such as presence of extracellular polymer matrix, biofilms offer more resistance to the penetration of antifungal agents and consequently light-sensitive drugs (34). Some others mechanisms of resistance have

been studied namely expression of resistance genes like those encoding efflux pump (35), slow growth rate leading to slow drug uptake, and decrease of ergosterol content and its biosynthetic gene expression (36-38), showing that biofilm resistance represents a multifactorial complex process (39). Strategies have been proposed for inactivation of biofilms, such as the combination of aPDT with conventional therapy, use of ultrasound, and nanoparticle-based drug delivery systems (27). In the present study, the proposed use NE aimed at not only increasing drug stability, but also permitting greater penetration of CIAIPc into biofilm. From the obtained results, cationic NE- CIAIPc combined with light dose of 100 J/cm^2 reached the best results for *C. albicans* biofilms, decreasing cell metabolism by approximately 70%. Mantareva et al. (26) demonstrated that silicon-phthalocyanine (SiPc) and germanium-phthalocyanine (GePc) had an incomplete penetration into *C. albicans* biofilms, and only SiPc promoted a reduction in the counts of viable colonies when fractionated illumination ($3 \times 150 \text{ J/cm}^2$) was used. In another study, aPDT with gallium-phthalocyanine promoted complete inactivation of *C. albicans* biofilms (27). In this latter study, the time of formation of the biofilms was only 18 hours, representing an intermediate stage. Comparing both studies, those authors demonstrated that more mature biofilms (>48 hours of formation) are more resistant to aPDT, presenting a lower decrease of viability compared with biofilms at intermediate stage. It is known that singlet oxygen acts not only on the fungal cell, but also on the extracellular matrix polysaccharides (39). Therefore, there is greater amount of extracellular matrix in mature biofilms, which requires more ROS production to alter this structure and consequently fungal cell viability.

As shown by the CLSM, there were different patterns of CIAIPc penetration into biofilms using the tested delivery systems. Free CIAIPc showed a higher

fluorescence on hyphal forms than yeasts. Greater susceptibility of hyphae to PDT has been reported by Jackson et al. (40) and attributed to cellular changes occurred during the transformation from yeast to hyphae. Moreover, the superficial layers of the biofilm presented a bright intense fluorescence, while in the basal layer the fluorescence was less intense, suggesting that the free CIAIPc did not penetrate effectively into the biofilm. For the cationic NE-CIAIPc, a better drug distribution between hyphae and yeasts was observed, which could explain its greater efficacy in reducing biofilm metabolism. However, as seen for the free CIAIPc, the deepest portions of biofilms were not as sensitized as the superficial layers, proving the difficulty in penetrating the biofilm structure. For the anionic NE-CIAIPc, the confocal images showed an intense fluorescence for the basal layers of *C. albicans* biofilms, indicating that this delivery system was able to penetrate more deeply into the biofilms. However, it was also observed the absence of fluorescence around or inside the yeasts or hyphae, which suggests that the fungal cells did not absorb the anionic NE-CIAIPc. Therefore, the confocal images complemented the XTT results, which showed no reduction of *C. albicans* biofilm metabolism when the anionic NE-CIAIPc was used.

From the obtained results, it was observed that the photodynamic effect of CIAIPc was dependent on type of drug delivery system, the superficial charge and light dose used. CIAIPc entrapped in cationic NE presented promising results for photokilling of *C. albicans* planktonic and biofilm cultures. This type of delivery system seems to offer greater stability to the light-sensitive drug for clinical use and permit its penetration into biofilms.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Center of Study in Optics and Photonics (CEPOF) at the Physics Institute of São Carlos (IFSC) of the University of São Paulo (USP) for developing the LED prototype used in this study. Also, they would like to thanks the Photobiology and Photomedicine Laboratory of the University of São Paulo at Ribeirão Preto. This work was supported by FAPESP - São Paulo Research Foundation (Grants 2008/03994-9 and 2010/05425-1; 2009/15363-9 F.L.P.).

References

- 1- Akpan, A. and R. Morgan (2002) Oral candidiasis. *Postgrad. Med. J.* 78, 455-459.
- 2- Calderone, R. A. and W. A. Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 327-335.
- 3- Banting, D. W., P. A. Greenhorn and J. G. McMinn (1995) Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J. Can. Dent. Assoc.* 61, 199-200, 203-205.
- 4- Nikawa, H., C. Jin, H. Fukushima, S. Makihira and T. Hamada (2001) Antifungal activity of histatin-5 against non-*albicans* *Candida* species. *Oral Microbiol. Immunol.* 16, 250-252.
- 5- Lombardi, T. and E. Budtz-Jorgensen (1993) Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.* 2, 17-22.
- 6- Donnelly, R. F., P. A. McCarron and M. M. Tunney (2008) Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.* 163, 1-12.

- 7- Chatterjee, D. K., L. S. Fong and Y. Zhang (2008) Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1627-1637.
- 8- Allison, R. R., H. C. Mota, V. S. Bagnato and C. H. Sibata (2008) Bio-nanotechnology and photodynamic therapy--state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 5, 19-28.
- 9- Mizuno, K., T. Zhiyentayev, L. Huang, S. Khalil, F. Nasim, G. P. Tegos, H. Gali, A. Jahnke, T. Wharton and M. R. Hamblin (2011) Antimicrobial Photodynamic Therapy with Functionalized Fullerenes: Quantitative Structure-activity Relationships. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2, 1-9.
- 10- Jori, G., C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti and G. Roncucci (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* 38, 468-481.
- 11- Konopka, K. and T. Goslinski (2007) Photodynamic Therapy in Dentistry. *J. Dent. Res.* 86, 694-707.
- 12- Machado, A. H., K. C. Moraes, C. Pacheco Soares, M. B. Junior and N. S. da Silva (2010) Cellular changes after photodynamic therapy on HEP-2 cells using the new ZnPcBr(8) phthalocyanine. *Photomed. Laser Surg.* 28 Suppl 1, S143-149.
- 13- Séguier, S., S. L. Souza, A. C. Sverzut, A. R. Simioni, F. L. Primo, A. Bodineau, V. M. Corrêa, B. Coulomb and A. C. Tedesco (2010) Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J. Photochem. Photobiol. B.* 101, 348-354.

- 14-Primo, F. L., M. V. Bentley and A. C. Tedesco (2008) Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *J. Nanosci, Nanotechnol.* 8, 340-347.
- 15-Schwartz, J., A. Wiehe, S. Gräfe, B. Gitter and M. Epple (2009) Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials.* 30, 3324-3331.
- 16-Fadel, M., K. Kassab and D. A. Fadeel (2010) Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers Med. Sci.* 25, 283-272.
- 17-Longo, J. P., S. C. Leal, A. R. Simioni, M. de Fátima Menezes Almeida-Santos, A. C. Tedesco and R. B. Azevedo (2011) Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med. Sci.* 2011. DOI 10.1007/s10103-011-0962-6.
- 18-da Volta Soares, M., M. R. Oliveira, E. P. dos Santos, L. de Brito Gitirana, G. M. Barbosa, C. H. Quaresma and E. Ricci-Júnior (2011) Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int. J. Nanomedicine.* 6, 227-238.
- 19-Rossetti, F. C., L. B. Lopes, A. R. Carollo, J. A. Thomazini, A. C. Tedesco and M. V. Bentley (2011) A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J. Control Release.* 155, 400-408.

- 20- Dovigo, L.N., A. C. Pavarina, A. P. Ribeiro, I. L. Brunetti, C. A. Costa, D. P. Jacomassi, V. S. Bagnato and C. Kurachi (2011) Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem. Photobiol.* 87, 895-903.
- 21- Kolarova, H., R. Lenobel, P. Kolar and M. Strnad (2007) Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. *Toxicol. In Vitro.* 21, 1304-1306.
- 22- Maftoum-Costa, M., K. T. Naves, A. L. Oliveira, A. C. Tedesco, N. S. da Silva and C. Pacheco-Soares (2008) Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell. Biol. Int.* 32, 1024-1028.
- 23- Longo, J. P., S. P. Lozzi, A. R. Simioni, P. C. Morais, A. C. Tedesco and R. B. Azevedo (2009) Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J. Photochem. Photobiol. B.* 94, 143-146.
- 24- Kyriazi, M., E. Alexandratou, D. Yova, M. Rallis and T. Trebst (2008) Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 24, 87-94.
- 25- Mantareva, V., V. Kussovski, I. Angelov, E. Borisova, L. Avramov, G. Schnurpfeil and D. Wöhrle (2007) Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 4829-4835.

- 26- Mantareva, V., I. Angelov, V. Kussovski, R. Dimitrov, L. Lapok and D. Wöhrle (2011) Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 4430-4440.
- 27- Mantareva, V., V. Kussovski, I. Angelov, D. Wöhrle, R. Dimitrov, E. Popova and S. Dimitrov (2011) Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10, 91-102.
- 28- Zhao, B., J. J. Yin, P. J. Bilski, C. F. Chignell, J. E. Roberts and Y. Y. He (2009) Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 163-172.
- 29- Dovigo, L. N., A. C. Pavarina, J. C. Carmello, A. L. Machado, I. L. Brunetti and V. S. Bagnato (2011) Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg. Med.* 43, 927-934.
- 30- Cormick, M. P., M. G. Alvarez, M. Rovera and E. N. Durantini (2009) Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 1592-1599.
- 31- Bertoloni, G., E. Reddi, M. Gatta, C. Burlini and G. Jori (1989) Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 957-966.
- 32- Giroldo, L. M., M. P. Felipe, M. A. de Oliveira, E. Munin, L. P. Alves and M. S. Costa (2009) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med. Sci.* 24, 109-112.

- 33- Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick and M. A. Ghannoum (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385-5394.
- 34- Konopka, K., B. Dorocka-Bobkowska, S. Gebremedhin and N. Düzgüneş (2010) Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 97, 413-417.
- 35- Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 255-267.
- 36- Mukherjee, P. K., J. Chandra, D. M. Kuhn and M. A. Ghannoum (2003) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* 71, 4333-4340.
- 37- García-Sánchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo and C. d'Enfert (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot. Cell.* 3, 536-545.
- 38- Kumamoto, C. A. and M. D. Vences (2005) Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 7, 1546-1554.
- 39- Pereira Gonzales, F. and T. Maisch (2012) Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 116, 1-10.
- 40- Jackson, Z., S. Meghji, A. MacRobert, B. Henderson and M. Wilson (1999) Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. *Lasers Med. Sci.* 14, 150-157.

Tables:

Table 1: Distribution of the controls and experimental groups.

Group	Treatment
NC	Negative control
LC	Light control
C -NE	Dark control- anionic NE-CIAIPc
C+NE	Dark control- cationic NE-CIAIPc
C CIAIPc	Dark control- free-CIAIPc
PDT 50-NE	PDT anionic NE-CIAIPc with 50 J/cm ²
PDT 50+NE	PDT cationic NE-CIAIPc with 50 J/cm ²
PDT 50 CIAIPc	PDT free-CIAIPc with 50 J/cm ²
PDT 100-NE	PDT anionic NE-CIAIPc with 100 J/cm ²
PDT 100+NE	PDT cationic NE-CIAIPc with 100 J/cm ²
PDT 100 CIAIPc	PDT free-CIAIPc with 100 J/cm ²

FIGURES:

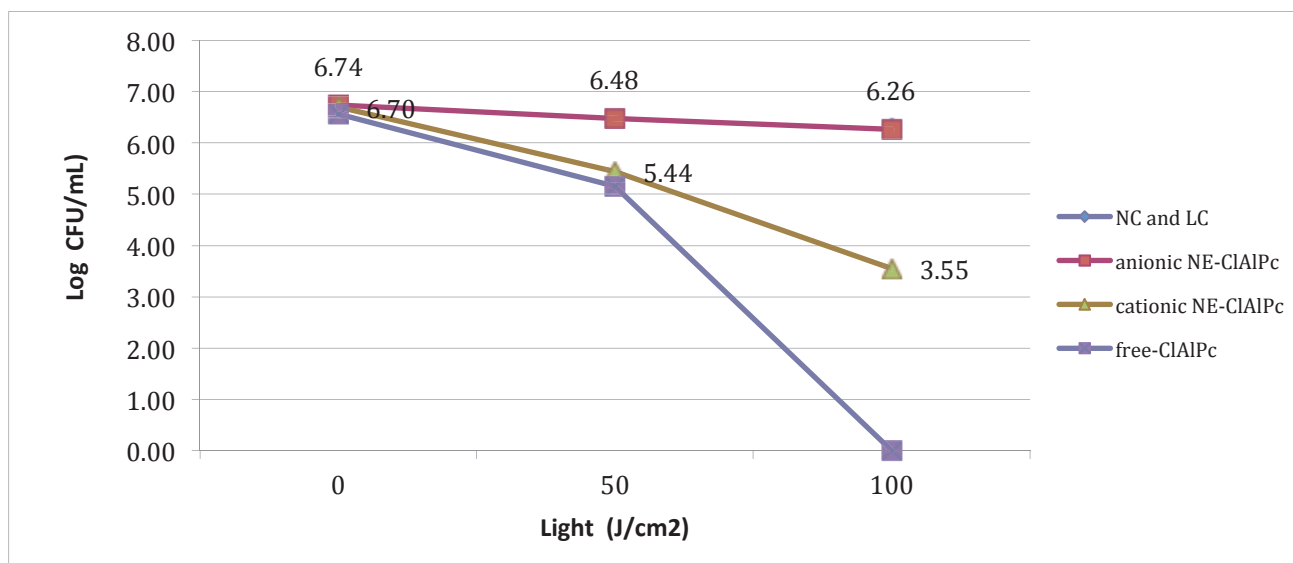


Figure 1: Line graphic representation of mean values and standard deviation of logarithmic of survival counts (CFU/mL) of *C. albicans* planktonic suspensions according to the light dose (0, 50 or 100 J/cm²) and drug delivery system (free, anionic or cationic NE- CIAIPc).

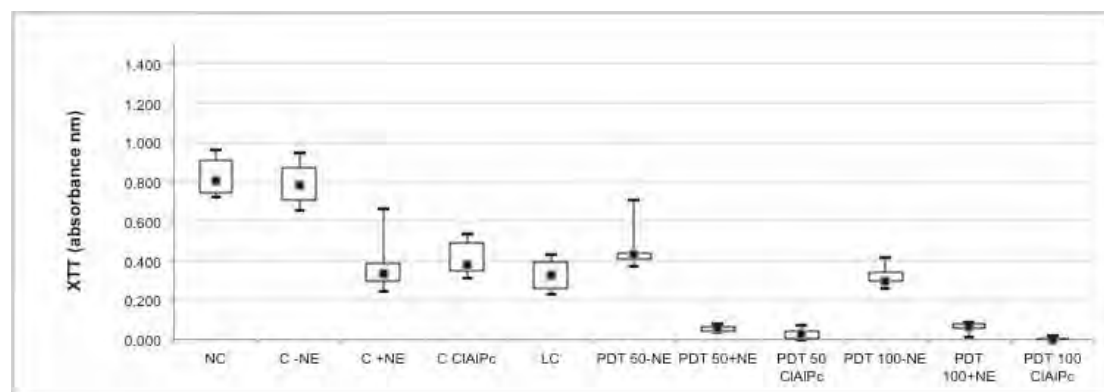


Figure 2: Box-plot graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) obtained for the *C. albicans* planktonic cultures subjected to the different experimental conditions. n=10.

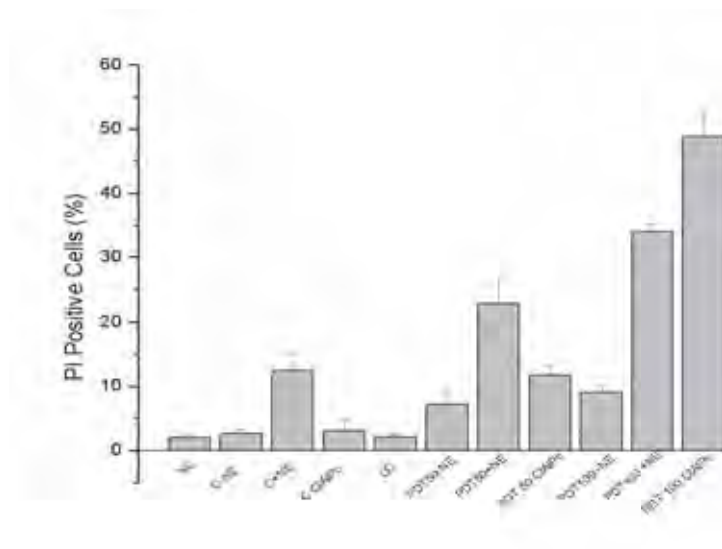


Figure 3: Graphic representation of mean values and standard deviation of PI-positive cells percentage of according to the different experimental conditions. n=6

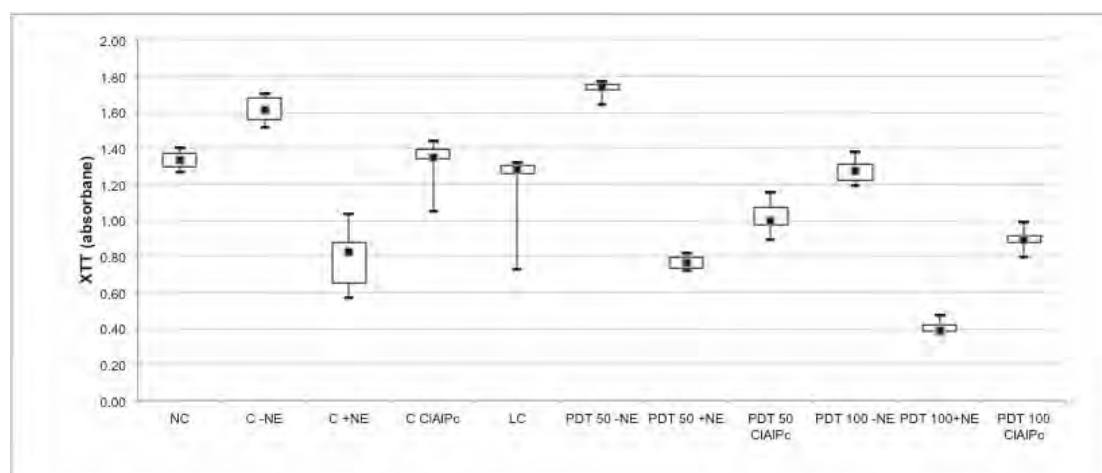


Figure 4: Box-plot graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) obtained for the *C. albicans* biofilms subjected to the different experimental conditions. n=10.

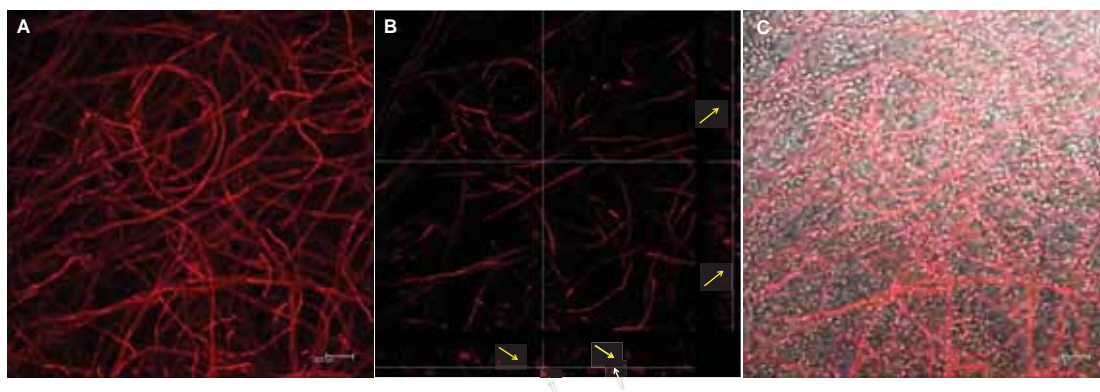


Figure 5. A: Overview of a 33.0- μm -thick *C. albicans* biofilm after 30 min of contact with free CIAIPc (red fluorescence; exc: 635 nm, em: 650-740 nm); B: Cross sections and side views of a 33.0- μm -thick *C. albicans* biofilm after 30 min of incubation with free CIAIPc. On the side views, it is possible to note the absence of sensitized cells in the deepest portion of the biofilm (yellow arrows), when compared with the outer layer (white arrows); C: the overlay of fluorescence of free CIAIPc with the light transmission mode. Original magnification: $\times 40$.

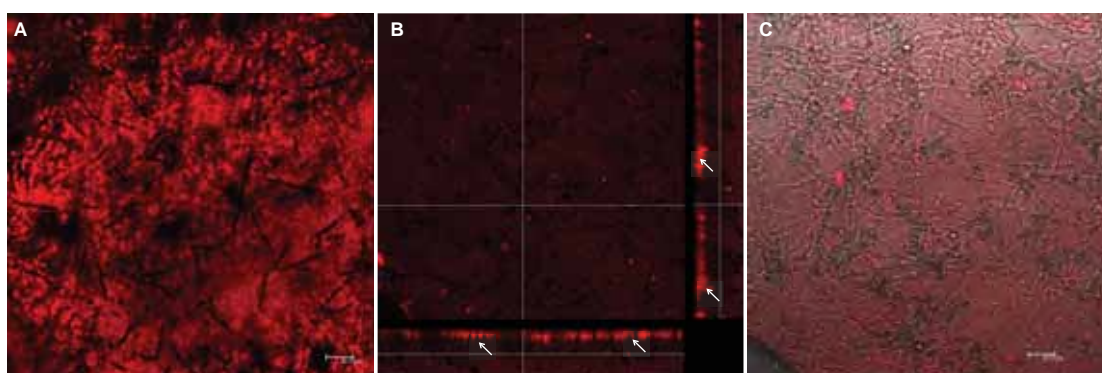


Figure 6. A: Overview of a 45.0- μm -thick *C. albicans* biofilm after 30 min of contact with anionic NE-CIAIPc (red fluorescence; exc: 635 nm, em: 650-740 nm); B: Cross sections and side views of a 45.0- μm -thick biofilm of *C. albicans* after 30 min of incubation with anionic NE-CIAIPc. On the side views, it is possible to observe

intense fluorescence in the deepest portion of the biofilm (white arrows); C: the overlay of fluorescence of anionic NE-CIAIPc with the light transmission mode. Original magnification: $\times 40$.

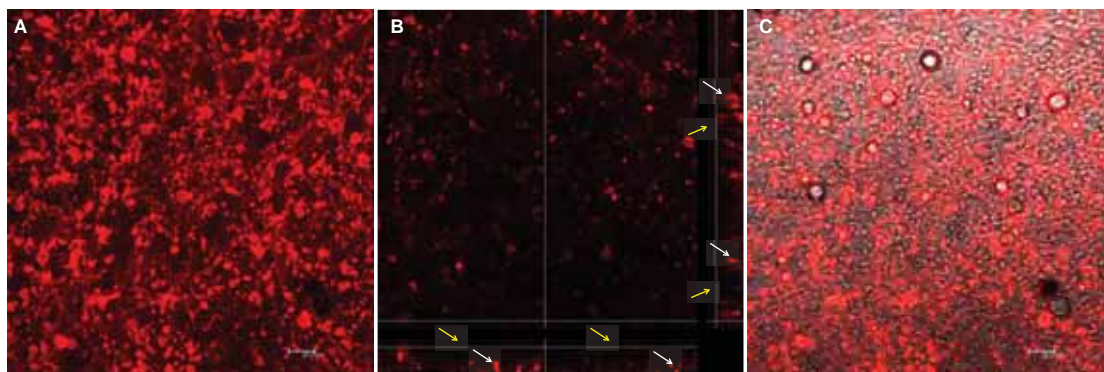


Figure 7. A: Overview of a 40.0- μm -thick biofilm of *C. albicans* after 30 min of contact with cationic NE-CIAIPc (red fluorescence; exc: 635 nm, em: 650-740 nm); B: Cross sections and side views of a 40.0- μm -thick biofilm of *C. albicans* after 30 min of incubation with cationic NE-CIAIPc. On the side views, it is possible to observe the absence of sensitized cells in the deepest portion of the biofilm (yellow arrows), when compared with the outer layer (white arrows); C: the overlay of fluorescence of cationic NE-CIAIPc with the light transmission mode. Original magnification: $\times 40$.

3.3 Capítulo 3

Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions

Ana Paula Dias Ribeiro, MS¹, Ana Cláudia Pavarina, PhD^{1†}, Mariana Carvalho Andrade, MS¹, Vanderlei Salvador Bagnato, PhD² & Antonio Cláudio Tedesco³

¹ Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, SP, Brazil.

²Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil

³Center of Nanotechnology and Tissue Engineers, Photobiology and Photomedicine research Group, FFCLRP- São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil.

Key words: MRSA, Photodynamic Therapy, Drug delivery systems, biofilms.

Running Title: Bacteria photokilling by phthalocyanine inside nanoemulsions

†Corresponding author: Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista/UNESP, Rua Humaitá, 1680, CEP 14801-903, São Paulo, Brasil. Phone: +55-016-3301-6410. Fax: +55-016-3301-6406. E-mail: pavarina@foar.unesp.br

* Artigo formatado nas normas do periódico “FEMS Microbiology letters”.

Abstract:

Antimicrobial photodynamic therapy represents an alternative method of killing resistant pathogens. Efforts have been made to develop delivery systems for hydrophobic drugs to improve the photokilling. This study evaluated the photodynamic effect of chloro-aluminum phthalocyanine (CIAIPc) encapsulated in nanoemulsions (NE) on methicillin susceptible and resistant *S. aureus* suspensions and biofilms. Suspensions and biofilms were treated with different delivery systems containing CIAIPc. After the pre-incubation period, the drug was washed-out and irradiation was performed with LED source (660 ± 3 nm). Negative control samples were not exposed to CIAIPc or light. For the suspensions, colonies were counted (CFU/mL). The metabolism of *S. aureus* suspensions and biofilms were evaluated by the XTT assay. The efficiency was dependent on the delivery system, superficial load and light dose. Cationic NE-CIAIPc and free-CIAIPc caused photokilling of the both strains of *S.aureus*. For biofilms, cationic NE-CIAIPc reduced cell metabolism by 80 and 73% of susceptible and resistant strains, respectively. Although anionic NE-CIAIPc caused a significant CFU/ml reduction for MSSA and MRSA, it was not capable of reducing MRSA biofilm metabolism. This therapy may represent an alternative treatment for eradicating resistant strains.

Introduction:

The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has emerged as an alternative treatment of skin and mucosa lesions and infections (Wainwright, 1998). However, unlike antitumor PDT, which has been used in some countries as an established therapeutic option, aPDT is still in the experimental phase (Bredell *et al.*, 2010). In this therapy, a non-toxic light-sensitive compound (known as photosensitizer - PS) is applied on the lesion and, after an incubation period to permit accumulation of the drug in the bacterial cells, the area is irradiated with a visible light source of appropriate wavelength with maximum absorption by the PS (Wainwright, 1998). With light excitation, the PS undergoes a transition to a more energetic state in which it is capable to react with molecules present in the medium and transfer electrons or hydrogen, leading to the production of reactive oxygen species (ROS) (type I reaction), or transfer energy to molecular oxygen, generating

the highly reactive singlet oxygen (type II reaction) (Konopka & Goslinski, 2007). The products of these reactions cause lethal oxidative damage to the bacterial cells.

The growing interest in aPDT is due to its ease of application and the fact that the ROS generated during the photodynamic reaction have a multifunctional nature and can damage multiple cellular structures, from membrane to organelles, reducing the chances of development of PDT-resistant strains (Maisch *et al.*, 2011). Unlike chemical agents, which have a continuous action and may induce the habituation of microorganisms to these drugs, the toxic products of aPDT are only generated when the PS is excited by a light source of specific wavelength, permitting a better control of its toxicity. In addition, the ROS have a short life in the biological systems and minimal diffusion, which restricts their oxidative damage to the site of PS application (Maisch *et al.*, 2011). Therefore, the use of photodynamic therapy with capacity to kill pathogenic bacteria without inducing resistance has been suggested as an alternative especially for microorganisms resistant to conventional treatments with antimicrobial agents. The development of antibiotic-resistant bacteria has become a major health problem worldwide, as it is responsible for significantly higher morbidity and mortality due to certain infections and increased healthcare costs (Diekema *et al.*, 2001). Among the several types of antibiotic-resistant pathogenic microorganisms, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is noteworthy. This microorganism has developed resistance to antimicrobial agents by several mechanisms that range from mutation to transduction (Ferro *et al.*, 2007). It has been associated with life-threatening infections in immunocompromised patients, which may lead to fatal bacteremia and septicemia (Jarraud *et al.*, 2002), and is frequently found in infections related to prostheses, catheters and other biomaterials (Grinholc *et al.*, 2007). MRSA are often found in biofilm formations, which act as protective coatings that attract various staph strains to form a microbial structure involved by an extracellular polymer matrix responsible for reducing the capacity of antibiotics to reach the microorganisms, increasing their the resistance to the treatment (Sharma *et al.*, 2008).

This way, strategies have been developed to increase the permeation of the light-sensitive agents into the bacterial biofilm structure and ensure the action of aPDT. The first step is the choice of the PS, which should preferably be a drug with an effective production of singlet oxygen and high oxidative power, such as phthalocyanines (Allison *et al.*, 2004). However, phthalocyanines are not water-

soluble and need delivery systems, such as polymeric micelles, liposomes, nanoparticles and nanoemulsions (NE). In addition, the inclusion of charges on the surface of these delivery systems has also been suggested to increase the physical attraction to the bacterial cells (Longo *et al.*, 2011). It is also known that in addition to acting directly on the bacterial cells, the products generated by aPDT also act on the extracellular matrix of biofilms (Pereira Gonzales & Maisch, 2012), increasing the photodynamic efficiency. Therefore, the aim of this study was to evaluate the photodynamic effect of chloro-aluminum-phthalocyanine (CIAIPc) encapsulated in cationic and anionic NE compared with CIAIPc diluted in organic solvent (free CIAIPc) on the inactivation of planktonic and biofilm cultures of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MRSA) and MRSA.

Methods:

Photosensitizer and light source

CIAIPc encapsulated in NE was kindly donated by the Center of Nanotechnology and Tissue Engineers, Photobiology and Photomedicine research Group of the University of São Paulo at Ribeirão Preto, Brazil. The NE preparation was obtained by spontaneous emulsification as previously described (Primo *et al.*, 2008). Initially, the surfactants were dissolved in 10 mL of spectroscopic acetone at 55 °C under magnetic stirrer. At the same time, the phthalocyanine was dissolved directly in Miglyol 812 N oil at 55 °C and was added to the phospholipid organic solution at a concentration of 1.0 mg/mL. The aqueous phase was obtained by dissolution of the biopolymer Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in ultra-pure water. The NE was formed by slow injection of the organic phase into the aqueous phase under magnetic stirring (300 rpm for 30 min) at 55 °C. The solvent was then evaporated under reduced pressure at approximately 75 °C, and the volume of the NE was concentrated to the initial volume of the aqueous phase. The amount of hydrophilic and lipophilic surfactants was fixed at 1% with a 1:1 weight ratio. The photophysical, chemical and biological properties were evaluated and presented similar response, as observed in other studies of the research (Primo *et al.*, 2008; Séguier *et al.*, 2010). The final concentration of CIAIPc in the NE was 31.8 µM and two NE with different superficial charges was developed, cationic and anionic. In order to compare this new delivery system with the free phthalocyanine, CIAIPc was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and was dissolved in DMSO to

give a 600 mM stock solution. Before the experiments, this solution was further diluted in PBS to obtain the same final concentration as the NE (31.8 μM).

Illumination of PS was carried out using a light system composed of red emitting diodes (LEDs) (LXHL - PR09; Luxeon III Emitter; Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA). The LED device provided a maximum emission at 660 nm and the irradiance delivered was of 38.1 mW/cm^2 .

Bacterial culture

The bacterial strains used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA): MSSA (ATCC 25923) and MRSA (ATCC 33591). Both isolates were maintained in Tryptic Soy Broth - TSB (Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, MD, USA) medium and frozen at -70°C until use. For the experiments, these bacteria were individually inoculated in 5 mL of TSB and grown aerobically overnight at 37°C . Each culture was harvested after centrifugation at 2,000 rpm for 10 min, washed twice with sterile distilled water and resuspended in PBS. Cell suspensions were standardized by spectrophotometer (Biospectro, EquiparLtda, Curitiba, PR, Brazil; model: SP-220) calibrated at 600 nm wavelength to give final concentration of 1×10^7 cells mL^{-1} .

Photodynamic inactivation studies in planktonic suspensions

Aliquots of 150 μL of the standardized MSSA and MRSA suspensions were individually transferred to separate eppendorfs and centrifuged to remove the supernatant. The cells were incubated with either the cationic and anionic NE containing the CIAIPC or the free CIAIPc for 30 min in the dark. After this pre-incubation time, the CIAIPC was washed out and 300 μL of PBS were added to the cells. The samples were transferred to a 24-well plate that was placed on the LED device for illumination at light fluences of 15 and 25 J/cm^2 for MSSA and 25 and 50 J/cm^2 for MRSA. Controls were established in order to determine whether CIAIPc alone and its delivery systems (dark toxicity controls) or light alone (light control-LC) induced any effect on bacteria viability. Therefore, additional wells containing MSSA and MRSA suspensions were exposed to the drug under identical conditions to those described above, but not to LED, and others were exposed only to irradiation. A negative control (NC) was also established consisting of bacterial suspensions not exposed to CIAIPc or LED.

The viability of the planktonic suspensions was evaluated by two methods: the number of colony forming units *per* milliliter (CFU/mL) and XTT assay. For the first method, aliquots of the contents of each well were serially diluted 10-fold in sterile saline to give dilutions of 10^{-1} to 10^{-3} times the original concentration. Triplicate 25 μ L aliquots were plated onto Mannitol Salt agar plates. All plates were aerobically incubated at 37°C for 24 h and thereafter colony counts of each plate were quantified (CFU/mL) using a digital colony counter (CP 600 Plus; Phoenix Dentsply Ind. e Com. Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brazil).

The XTT assay is a metabolic assay based on the reduction of a tetrazolium salt (XTT, Sigma-Aldrich). For this assay, 158 μ L of PBS were prepared with glucose at 200 mM, 40 μ L of XTT plus 2 μ L of menadione at 0.4 mM (Sigma-Aldrich) were mixed and transferred to each well. The plates were incubated in the dark at 37°C for 3 h. After this 100 μ L of the reacted XTT salt solution was transferred to a 96-well plate and cell viability was analyzed by proportional colorimetric changes and light absorbance measured by a microtiter plate reader (Thermo Plate - TP Reader) at 492 nm.

Biofilm growth and photodynamic inactivation studies in biofilms

Colonies of recently grown bacteria isolates on Manitol Agar were transferred to a Falcon tube containing RPMI 1640 and incubated overnight in an orbital shaker (AP 56, Phoenix Ind. e Com. Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brazil) at 120 rpm and 37°C. Cultures were centrifuged, and the supernatants were discarded. The cells were washed twice and finally resuspended in PBS. Standardized cell suspensions were obtained as described for the planktonic cultures. The resulting standardized suspensions were standpoint for every further procedure. Aliquots of 100 μ L of MSSA and MRSA standardized suspensions were transferred to a 96-wells microtiter plate and incubated for 90 min at 37°C in the orbital shaker at 75 rpm for the adhesion phase. After this period, each well was washed twice with PBS and 150 μ L of freshly prepared RPMI 1640 was added to each well. The plates were incubated for 48 h at 37°C in order to generate single-species biofilms.

After this period, the wells were carefully washed twice with 200 μ L of PBS to remove non-adherent cells. Aliquots of 150 μ L of CIAIPc encapsulated in NE or free were added to each appropriate well directly over the biofilm. The photosensitizers were left in contact with the biofilms for 30 min and then were

washed out. Aliquots of 150 μL of PBS were added to the wells before irradiation. The biofilms were illuminated using light fluences of 15 or 25 J/cm^2 for MSSA and 50 or 100 J/cm^2 for MRSA. The same experimental conditions described previously to planktonic cultures were performed in biofilms. The photodynamic effects against the biofilms were also evaluated using the XTT assay, as described previously.

Statistics

For analytical purposes, CFU/mL values were transformed into logarithm (\log_{10}). The results collected after the evaluation of aPDT against planktonic suspensions (log CFU/mL and XTT absorbance values) and biofilm cultures (XTT absorbance) presented heterocedasticity. The Kruskal-Wallis and Multiple Comparison based on pairwise ranking test were used to detect differences in CFU/mL and XTT absorbance values among the groups. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of aPDT on colony counts of planktonic suspensions

The photodynamic antimicrobial effect of CIAIPc encapsulated in cationic and anionic NE and free CIAIPc against MSSA (CFU/mL) is presented in Figure 1. The bacterial growth was directly dependent on the delivery system used (NE or free), superficial charge of the NE (cationic or anionic) and light fluence (15 or 25 J/cm^2). Free CIAIPc and cationic NE-CIAIPc promoted photokilling of MSSA when irradiated with the light fluence of 25 J/cm^2 . When combined with the light fluence of 15 J/cm^2 , cationic NE-CIAIPc and free CIAIPc caused 5 and 6 \log_{10} reduction of bacterial cell survival, respectively ($p < 0.05$). Although anionic NE-CIAIPc did not cause photokilling of MSSA, 2 and 4 \log_{10} reduction of bacterial cell survival was observed when irradiated with light fluences of 15 and 25 J/cm^2 , respectively ($p < 0.05$). The dark and light controls did not cause a significant decrease of bacterial growth and only the combined use of PS and light was capable of reducing the number of colonies.

For MRSA, the delivery system, superficial charge and light fluence also had a direct influence on colony counts after aPDT (Figure 2). Cationic NE-CIAIPc and free CIAIPc promoted photokilling of MRSA when illuminated with 50 J/cm^2 , which is twice the light fluence required for eradication of MSSA. Illumination of both

delivery systems with 25 J/cm² promoted ~5 log₁₀ reduction on CFU/mL. Anionic NE-CIAIPc in combination with the lower light fluence did not differ significantly from the negative control (p>0.05) and caused a significant reduction of bacterial cell survival (~1 log₁₀) only when illuminated with the 50 J/cm² light fluence.

Effect of aPDT on XTT absorbance values of planktonic suspensions

The XTT absorbance values for MSSA are depicted in Figure 3 and they were directly influenced by the light fluence and delivery system. The combination of CIAIPc and light reduced cell metabolism regardless of the delivery system. Considering the respective dark control as having 100% of cell metabolism, the anionic NE-CIAIPc reduced MSSA metabolism by 63.5 and 93.7% when combined with light fluences of 15 and 25 J/cm², respectively (p<0.05). For the cationic NE-CIAIPc, reductions of 72.5 and 86.5% in MSSA metabolism were observed with light fluences of 15 and 25 J/cm², respectively, considering the respective dark control as having as 100% of cell metabolism. Illumination of free CIAIPc with light fluences of 15 and 25 J/cm² reduced MSSA metabolism by 91 and 92%, respectively. For cationic NE-CIAIPc and free CIAIPc, the increase of light fluence did not result in significantly greater reduction in MSSA metabolism (p>0.05) and both of them had potential to cause a significant decrease in cell metabolism in dark conditions. However, the reduction in XTT absorbance values observed in the controls of these delivery systems was not sufficient to cause a significant reduction in the growth of MSSA (Figure 1).

For MRSA, the delivery system and light fluence were decisive in the antimicrobial effect of CIAIPc (Figure 4). Free CIAIPc presented the best results, reducing MRSA metabolism by approximately 96 and 92% when illuminated with light fluences de 25 and 50 J/cm², respectively, without significant difference (p>0.05) between them. For the cationic NE-CIAIPc, significant differences (p<0.05) were found between the light fluences; while no reduction in cell metabolism was observed with illumination at 25 J/cm², the 50 J/cm² light fluence reduced cell metabolism by 70%. Anionic NE-CIAIPc also presented a light fluence-dependent behavior, causing a significant reduction in MRSA metabolism (around 45%) only in combination with the higher light fluence. Regarding the dark controls, only the cationic NE-CIAIPc presented significant toxicity when compared with the negative

control ($p < 0.05$); the other controls did not affect significantly ($p > 0.05$) the metabolism of MRSA biofilms.

Effect of aPDT on XTT absorbance values of bacteria biofilms

The MSSA biofilms used in this study were mature (developed after 48 h) and were treated with CIAIPc encapsulated in different delivery systems for an incubation period of 30 min. The same light regimen as for the planktonic suspensions (660 nm LED, 15 and 25 J/cm²) was used. The absorbance values (XTT assay) for MSSA are presented in Figure 5 and they were influenced by the type of delivery system, superficial charge and light fluence. Cationic NE-CIAIPc was the only delivery system that presented significant dark toxicity to the biofilms ($p < 0.05$). However, considering the respective dark control as having 100% of metabolism, cationic NE-CIAIPc in combination with light fluences of 25 and 50 J/cm² decreased biofilm metabolism by 58% and 80%, respectively. Anionic NE-CIAIPc and free CIAIPc caused a significant decrease in the metabolism of MSSA biofilms only when irradiated with the higher light fluence - 42 and 43%, respectively.

MRSA biofilms were obtained in the same way as described for MSSA biofilms and their absorbance values (XTT assay) are depicted in Figure 6. Regardless of the light fluence, the cationic NE-CIAIPc was the most effective against MRSA biofilms, reducing their metabolism by 76.5 and 73.5% when illuminated with light fluences of 25 and 50 J/cm². Free-CIAIPc presented an intermediate behavior and caused a significant decrease in the metabolism of MRSA biofilms only when irradiated with the higher light fluence (55%). The anionic NE-CIAIPc was not capable of reducing MRSA biofilm metabolism, regardless of light fluence. The dark and light controls did not affect negatively the absorbance values when compared with the negative control (not exposed to CIAIPc or light), which indicates that the reductions in the metabolism of MRSA biofilms resulted from the photodynamic action of CIAIPc.

Discussion

The incidence of staphylococcal infections caused by antibiotic-resistant strains has led to the development of new therapeutic modalities, such as aPDT. To increase the success of this therapy, research has been directed on light-sensitive

drugs with photodynamic efficiency to kill microorganisms and new delivery systems to these drugs, which are hydrophobic compounds in most cases.

Among the second-generation PSs, the phthalocyanines are noteworthy because of their more effective production of singlet oxygen, with higher oxidative power compared with hematoporphyrin- and phenothiazine-derivatives. Their chemical structure permits the association of several metals, which increases the phototoxicity and ionic characteristics of these drugs (Tapajos *et al.*, 2008). In addition to their high photodynamic activity, phthalocyanines are easy to synthesize, have rapid elimination with minimal adverse effects and are commercially available (Kyriazi *et al.*, 2008). In spite of these advantages, the highly hydrophobic nature of phthalocyanines impairs their circulation in aqueous medium and increases the possibility of aggregate formation, making necessary the use of these drugs with organic solvents or delivery systems, such as polymeric micelles, liposomes, nanoparticles and NE, which are mainly employed in antitumor PDT (Primo *et al.*, 2008; Schwiertz *et al.*, 2009; Fadel *et al.*, 2010; Longo *et al.*, 2011). Most aPDT studies have used PS in aqueous solutions either diluted directly in saline or initially dissolved in an organic solvent, such as DMSO, and then diluted in aqueous medium, if necessary (Dovigo *et al.*, 2011). Although this is a viable procedure for *in vitro* experiments, clinical application of phthalocyanines using this form of delivery is difficult because saline and organic solvents are instable media, which would require preparation of the drug at the moment of use to ensure minimal alterations of its physical properties. Furthermore, DMSO is not an excellent delivery system for *in vivo* application because it increases the permeability of the host cells to the drug, possibly causing tissue damage and systemic effects. Among the drug delivery systems for aPDT, NE represent an excellent option as a topical delivery system with high capacity of penetration into the tissues (Primo *et al.*, 2008; Rossetti *et al.*, 2011), better biodistribution and greater drug stability, reducing the possibility of aggregate formation and loss of photodynamic efficiency (Zhao *et al.*, 2009). Therefore, the present study evaluated the phototoxic properties of CIAIPc encapsulated in cationic and anionic NE and compared with CIAIPc diluted in organic solvent in the photokilling of different planktonic suspensions and biofilms of *S. aureus* (MSSA and MRSA).

The results obtained for the planktonic suspensions revealed photokilling of both *S. aureus* strains (MSSA and MRSA) by CIAIPc encapsulated in cationic NE-

ClAlPc or diluted in DMSO. On the other hand, anionic NE-ClAlPc caused only a 4 log₁₀ reduction of MSSA cell survival and did not cause any reduction in MRSA CFU/mL. It is known that Gram-positive bacteria have a relatively thick cell-wall, composed basically by peptidoglycans and negatively charged due to the residues of teichoic acid (Lambert *et al.*, 2002). In this way, cationic molecules have greater affinity by the cell wall, facilitating the active transport of these drugs into the bacterial cells (Ferro *et al.*, 2007; Mantareva *et al.*, 2007; Spesia *et al.*, 2010; Mantareva *et al.*, 2011). Mantareva *et al.* (2007) evaluated the photodynamic effect of cationic and anionic hydrosoluble zinc-phthalocyanines against MSSA and MRSA and found that both strains were photokilled by the cationic phthalocyanine in concentrations up to 6 µM, while the anionic phthalocyanine needed higher light fluences to cause 3 to 4 log₁₀ reduction in *S. aureus* growth. A previous study evaluating the photodynamic efficiency of a porphyrin encapsulated in neutral and cationic liposomes showed a significant inhibition of MRSA growth only when the cationic phospholipid carrier was used, resulting in 4.5 and 6 log₁₀ reduction when the porphyrin was illuminated with a halogen light source for 5 and 10 min, respectively (Ferro *et al.*, 2007). Therefore, the superficial charge of the delivery system or even the drug itself is determinant on the photodynamic efficiency.

In addition, the lower affinity of the anionic delivery system by bacterial cells was influenced by removal of the excess of extracellular drug. Due to the optical characteristics of NE, after the pre-incubation period, the excess of extracellular NE was removed because their opaque characteristics made difficult light distribution in the bacterial suspensions and biofilms. This means that the antimicrobial phototoxic damages were caused exclusively by the drug that penetrated into the bacterial cells. The influence of absorption of light-sensitive drugs by target microorganisms on the efficiency of aPDT has been investigated in experiments with and without the drug present during irradiation. Grinholc *et al.* (2010) evaluated the photokilling potential of a protoporphyrin against MSSA and MRSA planktonic cultures and found that washout of the PS before illumination resulted in minimal bactericidal effect. A recent study, however, did not find significant difference in the phototoxic potential of a chlorine to *S. aureus* cultures with and without washout of the PS before illumination (Huang *et al.*, 2011). These results indicate that the type of delivery system and PS determine the capacity of the drug to penetrate into bacterial cell more rapidly than host cells. The capacity of cationic NE-ClAlPc to be readily absorbed by the target

cells, as demonstrated in the present study, is important because it limits the phototoxic damage to the cells that absorbed this PS, without causing damage to the subjacent normal cells.

Another interesting finding of the present study was that free CIAIPc and cationic NE-CIAIPc presented similar results in reducing CFU/mL of MSSA and MRSA planktonic suspensions. Tsai *et al.* (2009) compared two forms of encapsulation of hematoporphyrin (liposomes and polymeric micelles) and its free form (dilution in saline) in the photoinactivation of Gram-positive pathogens. The authors reported that photokilling was more effective when liposomes and polymeric micelles were used with porphyrin at lower concentrations. However, the three delivery systems had the same behavior when higher concentrations of porphyrin were used. Therefore, it may be speculated that the concentration used in the present study was sufficiently high to cause photoinactivation of the bacteria, as similar results were obtained for free CIAIPc and cationic NE-CIAIPc.

In the present study, in addition to the delivery system and superficial charge, the light fluence also influenced the aPDT efficiency. For both *S. aureus* strains, only the higher light fluence caused photokilling of the planktonic suspensions. For MSSA, photokilling of the microorganisms was observed when the cationic NE-CIAIPc and free CIAIPc were illuminated with a light fluence of 25 J/cm². Even for the anionic NE-CIAIPc, illumination with the higher light fluence resulted in a 4 log₁₀ reduction of bacterial cell survival, while a reduction of only 2 log₁₀ was observed with the lower light fluence. For MRSA, twice the light fluence (50 J/cm²) was necessary to a full photodynamic inactivation of this strain compared with MSSA. This higher resistance of MRSA to aPDT has been demonstrated (Grinholc *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009). Grinholc *et al.* (2008) reported that although no association was established between antibiotic resistance and photoinactivation, the results demonstrated that the different MRSA strains were less susceptible to aPDT than the MSSA strains. Tsai *et al.* (2009) also found that the methicillin-resistant strain was more resistant to aPDT than the MSSA, requiring a 4-fold higher concentration of hematoporphyrin to be inactivated. The greater resistance of MRSA strains to aPDT has been related to the capsular polysaccharide structure on the bacterial cell surface, which would limit the penetration of the PS into the MRSA cells, reducing the toxic effects of the ROS generated during photodynamic inactivation (Fournier *et al.*, 1989).

In addition to the photodynamic effect of ClAlPc on survival counts (CFU/mL) of MSSA and MRSA planktonic suspensions, the metabolism of the bacterial suspensions after aPDT was also evaluated using the XTT assay, which is based on MTT salt reduction by the active electron transport system of bacteria (Roslve & King, 1993). For MSSA, both forms of NE encapsulation and free ClAlPc resulted in accentuated reduction of cell metabolism, regardless of the light fluence used for irradiation of the drug. For MRSA, however, a significant reduction of bacterial cell metabolism was observed only when the higher light fluence (50 J/cm^2), except for free ClAlPc, which also reduced cell metabolism by approximately 96% when illuminated with the light fluence of 25 J/cm^2 . These results show that aPDT caused an initial alteration in the active electron transport of on cell membrane responsible for bacterial respiration. The results of the XTT assay showed that the cationic NE-ClAlPc and free ClAlPc presented a significant dark toxicity to MSSA planktonic suspensions, and only the cationic NE-ClAlPc was toxic in the dark to the MRSA planktonic suspensions.

Higher toxicity of cationic molecules, either the PS or the delivery system, has been previously reported (Schwiertz *et al.*, 2009; Kussovski *et al.*, 2009; Bourré *et al.*, 2010). Kussovski *et al.* (2009) evaluated the effect of cationic phthalocyanines against Gram-negative bacteria, and found photokilling of *Aeromonas* when one of the phthalocyanines was used at a concentration above $2 \mu\text{M}$. Bourré *et al.* (2009) reported that porphyrin at concentrations above $1 \mu\text{M}$ was also toxic when conjugated with a peptide, causing a ~ 3 to $6 \log_{10}$ reduction in CFU/mL counts of Gram-positive species, such as *S. aureus*. This higher toxicity of cationic molecules is related to their potential to bind more rapidly to microorganisms and alter the properties of their plasma membrane.

Regarding the biofilms, cationic NE-ClAlPc produced the best results, reducing the cell metabolism by around 80% and 76.5%, for MSSA and MRSA, respectively. Biofilms are structures formed by microorganisms involved by an extracellular polymer matrix and represent the most common form of bacterial organization in the nature (Chandra *et al.*, 2001). This polymer matrix reduced the permeation of antibacterial agents, increasing bacterial resistance and persistence of infections, and therefore, a number of strategies have been proposed to increase the permeability of biofilms to antimicrobial agents and PSs used in aPDT (Pereira

Gonzales & Maisch, 2012). Sharma *et al.* (2008) evaluated the effect of pretreatment with the chelating agent EDTA on the photoinactivation of staphylococcal biofilms, and found that this agent increased aPDT efficiency against *S. epidermidis* by disrupting the biofilm structure and reducing bacterial cell counts, but it did not improve the photodynamic action against *S. aureus* biofilms (Sharma *et al.*, 2008). A recent study evaluated the antimicrobial photodynamic potential of different types of cationic gallium-phthalocyanines (GaPc) against biofilms of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi (Mantareva *et al.*, 2011). The time of formation of the biofilms was only 18 h, representing an intermediate stage and they were treated with GaPc at 6 μM and LED light at 50 J/cm^2 . The aPDT caused photokilling of the fungal biofilms and maximum 1 to 2 \log_{10} reduction on in the counts of viable colonies of the bacterial biofilms. The authors suggested that because of the longer time required for replication of fungal cells, the period of 18 h resulted in fungal biofilms with a smaller number of microorganisms when compared with the bacterial biofilms, which were more resistant. Although complete reduction of biofilm metabolism was not achieved, aPDT with cationic NE-CIAIPc appeared as a good option as it reduced the metabolism of both *S. aureus* biofilms. In addition, it is known that singlet oxygen, a product of the photodynamic reaction, also acts on the extracellular matrix polysaccharides (Pereira Gonzales & Maisch, 2012), causing disruption of this structure and facilitating the action of other therapies used in combination with aPDT. The cationic NE-CIAIPc presented promising results for the photokilling of planktonic and biofilm cultures of MSSA and MRSA, offering greater stability to the drug for clinical application and greater permeation of biofilms with a more efficient action against the microorganisms.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Center of Study in Optics and Photonics (CEPOF) at the Physics Institute of São Carlos (IFSC) of the University of São Paulo (USP) for developing the LED prototype used in this study. Also, they would like to thanks the Photobiology and Photomedicine Laboratory of the University of São Paulo at Ribeirão Preto. This work was supported by FAPESP - São Paulo Research Foundation (Grants 2008/03994-9 and 2010/05425-1).

Authors Contribution:

All authors have made substantive contribution on this study and/or manuscript, and all have reviewed the final paper prior to its submission.

References

- Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJH & Sibata CH (2004) Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **1**: 27–42.
- Bourré L, Giuntini F, Eggleston IM, Mosse CA, MacRobert AJ & Wilson M (2010) Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochem Photobiol Sci*. **9**: 1613-1620.
- Bredell MG, Besic E, Maake C & Walt H (2010) The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: a short review. *J Photochem Photobiol B* **101**:185-190.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T & Ghannoum MA (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* **183**: 5385-5394.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M & SENTRY Participants Group (2001) Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. **32** (suppl 2): S114-132.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS & Kurachi C (2011) Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* **87**: 895-903.
- Fadel M, Kassab K & Fadeel DA (2010) Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers Med Sci* **25**:283-272.
- Ferro S, Ricchelli F, Monti D, Mancini G & Jori G (2007) Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:1026-1034.

- Fournier JM, Boutonnier A & Bouvet A (1989) *Staphylococcus aureus* strains which are not identified by rapid agglutination methods are of capsular serotype 5. *J Clin Microbiol* **27**: 1372-1374.
- Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A & Bielawski KP (2008) Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B* **90**: 57-63.
- Grinholc M, Wegrzyn G & Kurlenda J (2007) Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**:375-379.
- Grinholc M, Zawacka-Pankau J, Gwizdek-Wiśniewska A & Bielawski KP (2010) Evaluation of the role of the pharmacological inhibition of *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pumps and the variable levels of the uptake of the sensitizer in the strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to PPAArg(2)-based photodynamic inactivation. *Photochem Photobiol* **86**: 1118-1126.
- Huang L, Zhiyentayev T, Xuan Y, Azhibek D, Kharkwal GB & Hamblin MR (2011) Photodynamic inactivation of bacteria using polyethylenimine-chlorin(e6) conjugates: Effect of polymer molecular weight, substitution ratio of chlorin(e6) and pH. *Lasers Surg Med* **43**: 313-323.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J & Vandenesch F (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* **70**: 631-641.
- Konopka K & Goslinski T (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* **86**: 694-707.
- Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, Borisova E & Avramov L (2009) Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* **294**: 133-140.
- Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M & Trebst T (2008) Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **24**:87-94.

- Lambert PA (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* **92** (suppl): 46S-54S.
- Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fátima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC & Azevedo RB (2011) Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med Sci* In press.
- Maisch T, Hackbarth S, Regensburger J, Felgenträger A, Bäuml W, Landthaler M & Röder B (2011) Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J Dtsch Dermatol Ges* **9**: 360-366.
- Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Borisova E, Avramov L, Schnurpfeil G & Wöhrle D (2007) Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg Med Chem* **15**: 4829-4835.
- Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E & Dimitrov S (2011) Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* **10**: 91-102.
- Pereira Gonzales F & Maisch T (2012) Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol* **116**:1-10.
- Primo FL, Bentley MV & Tedesco AC (2008) Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol* **8**:340-347.
- Roslev P & King GM (1993) Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2891-2896.
- Rossetti FC, Lopes LB, Carollo AR, Thomazini JA, Tedesco AC & Bentley MV (2011) A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release* **155**: 400-408.
- Schwartz J, Wiehe A, Gräfe S, Gitter B & Epple M (2009) Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials* **30**:3324-3331.

- Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, Corrêa VM, Coulomb B & Tedesco AC (2010) Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B* **101**:348-354.
- Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK & Speziale P (2008) Toluidine blue-mediated photodynamic effects on *staphylococcal* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 299-305.
- Spesia MB, Rovera M & Durantini EN (2010) Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur J Med Chem* **45**: 2198-2205.
- Tapajós EC, Longo JP, Simioni AR, Lacava ZG, Santos MF, Morais PC, Tedesco AC & Azevedo RB (2008) In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. *Oral Oncol* **44**:1073-1079.
- Tsai T, Yang YT, Wang TH, Chien HF & Chen CT (2009) Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg Med* **41**: 316-322.
- Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* **42**:13-28.
- Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE & He YY (2009) Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* **241**: 163-172.

Figures

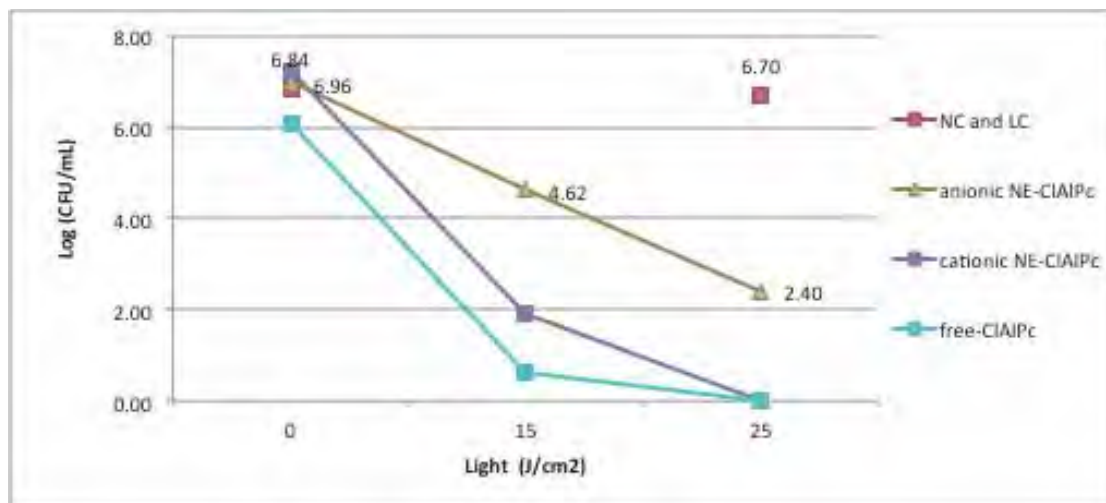


Figure 1. Line graphic representation of mean values and standard deviation of logarithmic of survival counts (CFU/mL) of MSSA planktonic suspensions according to the light dose (0, 15 or 25 J/cm²) and drug delivery system (free, anionic or cationic NE- CIAIPc).

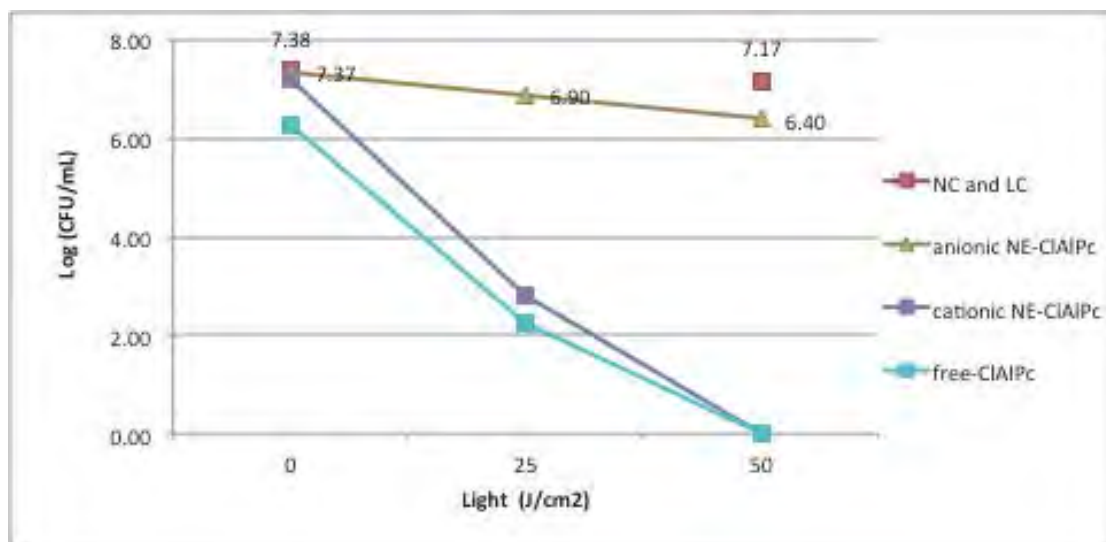


Figure 2. Line graphic representation of mean values and standard deviation of logarithmic of survival counts (CFU/mL) of MRSA planktonic suspensions according to the light dose (0, 15 or 25 J/cm²) and drug delivery system (free, anionic or cationic NE- CIAIPc).

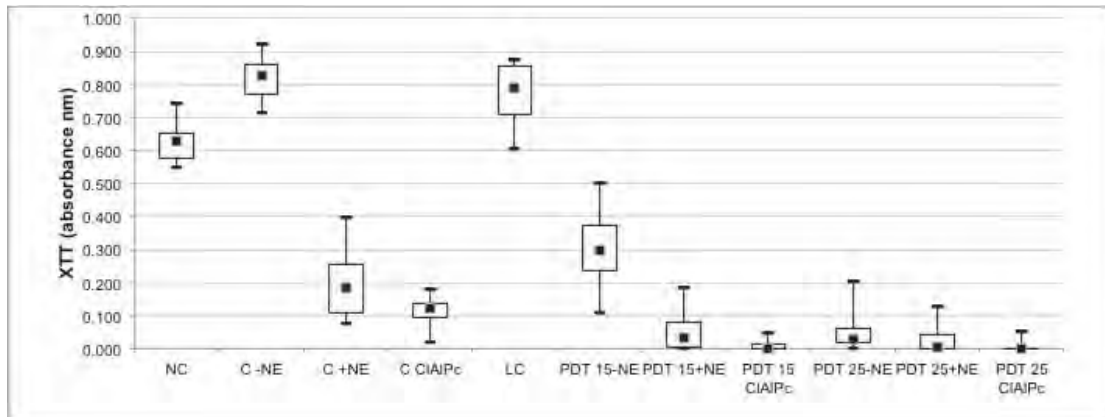


Figure 3. Box-plot graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) obtained for the MSSA planktonic cultures subjected to the different experimental conditions. n=10.

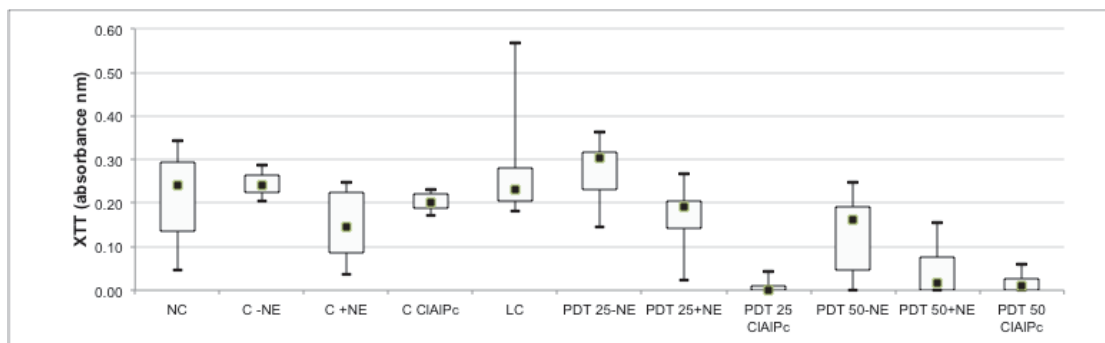


Figure 4. Box-plot graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) obtained for the MRSA planktonic cultures subjected to the different experimental conditions. n=10.

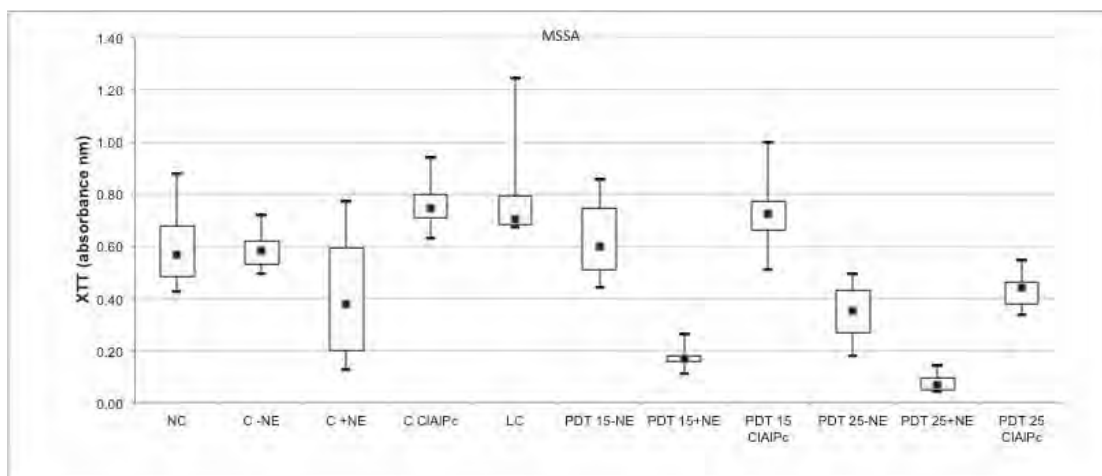


Figure 5. Box-plot graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) obtained for the MSSA biofilms subjected to the different experimental conditions. n=10.

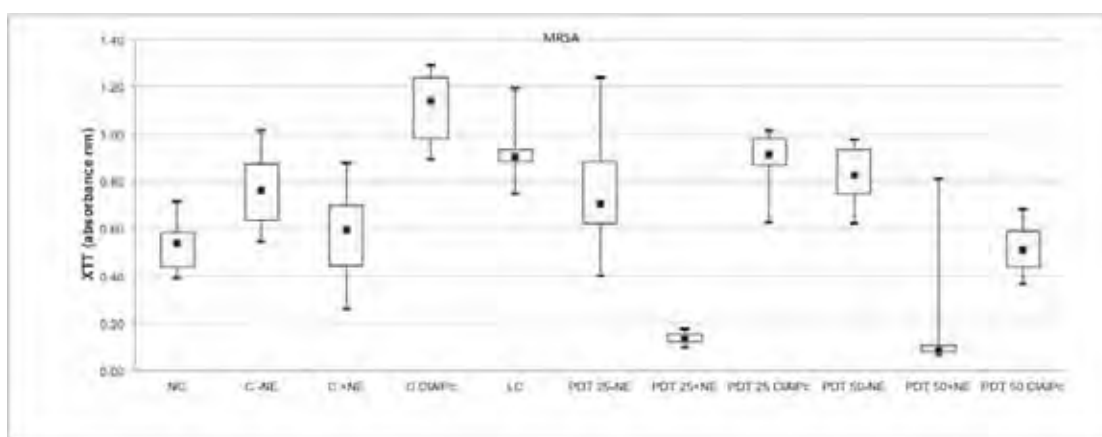


Figure 6. Box-plot graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) obtained for the MRSA biofilms subjected to the different experimental conditions. n=10.



4 Discussão

4 Discussão

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana tem sido sugerida como tratamento alternativo para infecções superficiais de mucosa e derme⁸², onde estão presentes micro-organismos susceptíveis e resistentes aos tratamentos convencionais. Entretanto, apesar de passados 100 anos da primeira publicação sobre efeitos fotodinâmicos de compostos químicos contra micro-organismos⁶¹, a PDT com enfoque antimicrobiano ainda se encontra em fase de experimentação⁶. Até o momento, os estudos buscam determinar parâmetros adequados para aplicação clínica da PDT antimicrobiana, o que envolve avaliar diferentes fotossensibilizadores, fontes e doses de luz, concentrações dos fármacos, e, até mesmo, sistemas para veiculação desses fármacos fotossensíveis. Diante disso, nossos estudos têm procurado identificar fotossensibilizadores com atividade antimicrobiana quando associada a luz LED, uma fonte de luz de menor custo e tecnologia mais simples comparada com a dos aparelhos laser, facilitando a aplicação clínica dessa terapia³⁹.

Dessa forma, o objetivo do primeiro estudo (Capítulo 1) foi avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico de diferentes concentrações de curcumina e doses de luz LED de comprimento de onda azul (predominantemente em 455nm) na inativação de suspensões planctônicas de bactérias gram-positivas (MSSA e MRSA). Além disso, a partir de parâmetros eficazes para inativação destas bactérias, foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos da PDT em cultura celular de fibroblastos. A possibilidade de utilizar a curcumina como fotossensibilizador advém de sua atividade antimicrobiana mesmo na ausência de luz. Wang et al.⁸³ observaram que a concentração mínima inibitória (CMI) da curcumina contra *S. aureus* na ausência de luz foi de 62,5 mg/L. Outro estudo avaliou a ação antifúngica da curcumina e observou que a CMI contra diferentes cepas de *Candida* spp. variou de 32 a 256 mg/L⁵³. Sharma et al.⁶⁸, comparando a inativação fúngica pela curcumina em diferentes meios, verificaram inibição do crescimento fúngico em meio líquido a partir de 185 mg/L, enquanto que maiores concentrações foram necessárias (296-370 mg/L) para inibição de crescimento do fungo em meio sólido.

No entanto, quando associada a luz, a curcumina tem seu efeito antimicrobiano potencializado, requerendo concentrações em ordem de micromolar para causar fotoinativação de micro-organismos, como observado no Capítulo 1. Os

* Dados originais apresentados no Apêndice referente ao Capítulo 1

resultados demonstraram que a curcumina associada à luz azul causou efeitos tóxicos em ambas as cepas de *S. aureus*, sendo esse efeito dependente da concentração de curcumina, da dose de luz empregada e da cepa avaliada. A concentração de 5 μM associada a menor dose de luz (18 J/cm^2) promoveu completa inativação do MSSA, sendo que as concentrações inferiores (0,1; 0,5 e 1 μM) causaram uma redução dose-dependente significativa do número de colônias (CFU/mL). Essa capacidade da curcumina em inativar bactérias quando associada a luz já foi previamente descrita em alguns estudos^{17,32,79}. Haukvik et al.³² observaram que a concentração de 2,5 μM foi suficiente para inativar completamente bactérias Gram positivas, sendo que uma concentração de 25 μM foi necessária para inativar a *E. coli*. A fototoxicidade contra micro-organismos é mediada pelos estados excitados da curcumina e/ou produtos provenientes de reação com oxigênio durante o período de irradiação⁶⁰. Dessa forma, a luz é responsável por excitar a curcumina a um estado triplo, resultando em transferência de energia ou de elétrons para o oxigênio molecular o que resulta na formação de EROs, responsáveis pelos danos às células dos micro-organismos⁷⁰.

Os resultados também demonstraram que para inativação da cepa resistente do *S. aureus*, uma maior concentração de curcumina (20 μM) e dose de luz (37,5 J/cm^2) foram necessárias. Dessa forma, a cepa resistente à meticilina também apresentou-se mais resistente à PDT, sendo necessária uma concentração 4 vezes maior para sua completa inativação. Estudos recentes também observaram serem necessárias maiores concentrações de FS para completa inativação do MRSA quando comparadas a cepas de MSSA^{29,30,62}. Grinholc et al.³⁰ observaram que a resposta à PDT não foi homogênea quando comparou diferentes isolados clínicos do MSSA e MRSA, uma vez que foi observada uma variação de 0 a 3 log de redução de UFC/mL quando se associou uma protoporfirina a luz visível para fotossensibilização das cepas. Esses autores observaram que o MRSA apresentou um maior número de cepas resistentes à PDT quando comparadas ao MSSA, assim como observado em nosso estudo. Tsai et al.⁸⁰ também verificaram que a susceptibilidade do MRSA à PDT foi menor quando comparado a outras cepas susceptíveis aos antibióticos (MSSA). Essa maior resistência a PDT observada para espécie MRSA tem sido atribuída a presença de uma cápsula de polissacarídeos na superfície celular dessa bactéria, a qual reduz a penetração do fotossensibilizador para o interior da célula e conseqüentemente reduz os efeitos tóxicos resultantes das EROs produzidas⁷⁷. Sabe-se que a PDT é um tratamento não específico e efetivo contra patógenos susceptíveis e resistentes a

antibioticoterapia⁸⁰. Entretanto, até o momento, alguns estudos têm relatado que o efeito da PDT é dependente do tipo de micro-organismo, da cepas e do isolado clínico, de forma que existem isolados de MRSA altamente sensíveis a PDT e isolados mais resistentes aos seus efeitos³⁰. Em nosso estudo, as cepas ATCC avaliadas apresentaram comportamentos distintos, uma vez que as bactérias susceptíveis à metilicina foram mais sensíveis à PDT quando comparados aquelas resistentes a esse antibiótico. Dessa forma, se torna importante a avaliação da susceptibilidade de micro-organismos resistentes aos tratamentos convencionais quando submetidos à PDT para verificar a possibilidade de utilizar essa terapia no tratamento de infecções superficiais nas quais a prevalência desses micro-organismos tem aumentado.

Sabe-se que ao contrário dos antibióticos que possuem um único alvo na célula do micro-organismo, as espécies reativas geradas pela reação da PDT têm caráter multifuncional, podendo danificar diversas estruturas celulares, reduzindo a possibilidade de desenvolvimento de cepas resistentes a essa terapia³⁹. No entanto, esse aspecto passa a ser uma limitação na PDT, pois as células do hospedeiro também são suscetíveis a ação das EROs. O desafio dessa terapia é encontrar uma janela terapêutica, na qual os micro-organismos sejam erradicados sem causar danos os tecidos sadios do hospedeiro³⁰. Dessa forma, o presente estudo também avaliou o efeito da PDT, utilizando parâmetros antimicrobianos efetivos para inativação das bactérias, em cultura de fibroblastos L929. Foi observada uma redução do metabolismo celular dos fibroblastos de 68,1; 75,1 e 80% para a associação de 5, 10 e 20 μ M de curcumina com LED, respectivamente. Redução de 66,5% da viabilidade celular de fibroblastos de derme humana também foi verificada no estudo de Grinholc et al.³⁰ que avaliou a toxicidade da PDT mediada por uma porfirina. Esse mesmo parâmetro foi capaz de reduzir 99,9% da viabilidade de culturas planctônicas de MRSA³⁰. Ainda que a redução do metabolismo celular tenha sido elevada em nosso estudo, não foi suficiente para causar completa inibição da enzima desidrogenase succínica, sugerindo que tanto MSSA quanto o MRSA foram mais susceptíveis à PDT do que os fibroblastos L929. Dovigo et al.²³ também obtiveram resultados semelhantes quando aplicaram os parâmetros utilizados para inativação de fungos com a curcumina em cultura de macrófagos. Enquanto observou-se completa inativação de suspensões planctônicas da *C. albicans*, o metabolismo celular dos macrófagos não foi completamente reduzido²³. É importante ressaltar que os estudos

in vitro não simulam todas as condições presentes *in vivo* e não apresentam a resposta de defesa do próprio organismo, como a ação de agentes antioxidantes endógenos, tais como peroxidases e catalases, capazes de promover a degradação enzimática das EROs²⁵.

De acordo com as imagens da MEV, os grupos de fibroblastos submetidos à PDT apresentaram redução do número de células aderidas ao substrato de vidro. Além disso, diversos restos citoplasmáticos permaneceram aderidos à lamínula, indicando rompimento da membrana citoplasmática e sugerindo um processo de morte celular por necrose. A localização do fotossensibilizador é de extrema importância para a definição do tipo de morte celular ocorrida após a PDT. Geralmente, os fotossensibilizadores que se acumulam nas mitocôndrias ou retículo endoplasmático causam apoptose; enquanto, os que se acumulam na membrana plasmática ou lisossomos predispõem as células para necrose⁹. Os estudos têm indicado que a curcumina se liga preferencialmente a membrana lipídica e algumas proteínas celulares⁶⁰. Bruzell et al.⁷ observaram que a concentração de 13,5 µM de Curcumina associada a irradiação com luz halógena (6 J/cm²) resultou em 80% de morte por necrose, não chegando a 20% a morte induzida por apoptose.

Outro fator relacionado ao potencial da curcumina como fotossensibilizador é o meio utilizado para veicular a droga. Por ser um composto relativamente insolúvel em água, diferentes diluentes como acetona, dimetilsulfoxide (DMSO) e etanol, além de outras preparações como micelas, ciclodextrina, lipossomos e polímeros hidrofílicos têm sido sugeridos para veicular a Curcumina^{7,69}. O DMSO tem sido o veículo mais utilizado para avaliar os efeitos da PDT em estudos *in vitro* e tem se tornado como um controle para avaliar diversos tipos de veiculação de fármacos, pois apresenta excelente propriedade como solvente^{17,32,79}. Em nosso estudo, ao ser diluída em DMSO, a Curcumina aumentou sua solubilidade em soluções aquosas melhorando sua biodisponibilidade, resultando em completa inativação dos micro-organismos⁴⁰. Bruzell et al.⁷ observaram que a utilização de 13,5 µM de Curcumina quando diluída em DMSO foi suficiente para redução de 80% da viabilidade celular de células glandulares de rato, sendo que a mesma concentração quando preparada em ciclodextrina ou lipossomo não resultou em redução da atividade enzimática. Da mesma forma, Haukvik et al.³² obtiveram resultados semelhantes aos encontrados com DMSO somente para o surfactante PEG 400, sendo que os demais veículos avaliados não resultaram em completa inativação da *E. coli*.

Sabe-se que o DMSO não representa um ótimo veículo para aplicação *in vivo*, pois aumenta a permeabilidade aos fármacos e pode causar danos teciduais e efeitos sistêmicos. Sendo assim, são necessários estudos que avaliem diferentes formas de veiculação dos fotossensibilizadores hidrofóbicos e que apresentem resultados tão positivos quanto àqueles obtidos com o DMSO.

A busca por um tipo de veiculação mais estável levou ao desenvolvimento dos Capítulos 2 e 3 juntamente com o Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual do Departamento de Química da Universidade de São Paulo-Campus Ribeirão Preto. Esse grupo tem desenvolvido novos sistemas de veiculação de fármacos hidrófobos, como por exemplo, a ftalocianina, que é considerada um FS da segunda geração, com maior rendimento na produção de oxigênio singlete, apresentando poder oxidativo aumentado quando comparado ao dos derivados da hematoporfirina e fenotiazínicos^{47,66}. Apesar dessas vantagens, esses compostos são altamente hidrofóbicos, o que dificulta sua circulação em meio aquoso e aumenta a possibilidade de formação de agregados⁵⁹. Dessa forma, novos sistemas de veiculações de fármacos que apresentem compartimentos hidrófobos para solubilização das ftalocianinas têm sido desenvolvidos, como micelas poliméricas, lipossomos, nano-partículas e nano-emulsões (NE)^{26,44,59,65}. Dentre essas veiculações, as nano-emulsões representam uma opção de aplicação tópica¹⁶, e dessa forma, podem ser empregadas em infecções superficiais por fungos e bactérias. Esse tipo de veiculação da ftalocianina já foi avaliada quanto ao seu potencial antitumoral e em infecções de patógenos periodontais^{59,64,66}. A ftalocianina veiculada em nano-emulsões apresenta alto poder de penetração nos tecidos^{59,64}. Além disso, esse tipo de veiculação garante melhor biodistribuição do fármaco, reduzindo a possibilidade de agregação e redução da sua eficiência fotodinâmica, além de fornecer maior estabilidade para o mesmo⁸⁷. Em geral, a maioria dos estudos de PDT tem utilizado FS em soluções aquosas diluídos diretamente em soluções tampões ou mesmo com dissolução inicial em solvente orgânico como DMSO e depois em meio aquoso²³. Ainda que esse seja um procedimento viável para experimentos *in vitro*, a aplicação clínica de fármacos se torna difícil uma vez que os meios são instáveis, exigindo que o FS seja preparado no momento da aplicação para garantir mínima alteração nas propriedades físicas do mesmo. Dessa forma, a NE utilizada nesse estudo permite

* Dados originais apresentados no Apêndice referente aos Capítulos 2 e 3

maior facilidade na aplicação clínica, uma vez que mantém as propriedades fotossensibilizadoras da CIAIFt⁵⁹, além disso apresenta maior viscosidade o que favorece a aplicação clínica.

Os resultados apresentados nos Capítulos 2 e 3 demonstraram que a PDT com CIAIFt foi efetiva na redução da viabilidade da *C. albicans*, MRSA e MSSA quando em suspensão planctônica e biofilmes. Essa redução foi dependente do tipo de veiculação, carga superficial e dose de luz empregadas. Para a suspensão planctônica de *C. albicans*, a CIAIFt livre apresentou os melhores resultados na redução do número de CFU/mL, uma vez que sua associação com dose de luz LED de 100 J/cm² resultou em completa inativação desse fungo. O estudo de Mantareva et al.⁵⁰ também observou completa inativação da *C. albicans* quando associou-se silício-ftalocianina ao LED, sendo que a germânio-ftalocianina reduziu em apenas 1 log o crescimento do fungo. Segundo os autores, o grupo metálico utilizado na estrutura do FS é importante na avaliação do potencial fotodinâmico do fármaco, pois são responsáveis pelo aumento da fototoxicidade da ftalocianina e pelas características iônicas das mesmas³⁷.

Os resultados demonstraram que para as NE não foi observada completa inativação das suspensões planctônicas de *C. albicans*, entretanto a NE catiônica associada a uma dose de luz de 100 J/cm² reduziu em cerca de 3 log o CFU/mL. Por outro lado, foi observada completa inativação de ambas as cepas de *S. aureus* (MSSA e MRSA) pela CIAIFt quando veiculada pela NE catiônica ou diluída em DMSO e associadas a doses de luz de 25 e 50 J/cm², respectivamente. Essa maior dificuldade em inativar a *C. albicans* quando comparada a bactérias já foi observada anteriormente por outros estudos^{19,86}. Deminova e Hamblin¹⁹, comparando três agentes fotossensibilizadores, verificaram que a *C. albicans* foi mais resistente à PDT em comparação com as bactérias para os três FSs avaliados. Segundo Zeina et al.⁸⁶, a célula fúngica, além de ser eucariótica, é cerca de 25 a 50 vezes maior que a célula bacteriana. A inativação da *C. albicans* com a PDT é um processo múltiplo e complexo, no qual a saturação de mais de um componente celular é necessário para causar a morte, ao contrário das bactérias cujo processo é mais simples. Como a efetividade da PDT é dependente da formação de EROs e oxigênio singlete, uma maior quantidade desses componentes deve ser produzida para atuar em uma célula de maior tamanho e que possui uma variedade de alvos, inclusive uma barreira adicional

como a membrana nuclear¹⁹. Dessa forma, para inativar espécies de *Candida* são necessários uma maior concentração de FS e uma maior dose de luz.

A NE aniônica associada a maior dose de luz avaliada para cada micro-organismo resultou em apenas redução de 4 log para o MSSA, e não causou nenhuma redução nos valores de CFU/mL do MRSA e *C. albicans*. Essa maior eficiência de fármacos catiônicos já foi demonstrada em estudos anteriores^{15,51}. Cormick et al.¹⁵ avaliaram a ação fotodinâmica de porfirinas catiônicas e aniônicas em suspensões de *C. albicans* e verificaram que a porfirina aniônica não apresentou nenhum potencial antimicrobiano mesmo após 3 horas de irradiação, o que foi confirmado pela menor fluorescência no interior das células fúngicas evidenciando baixa afinidade desse FS pela célula fúngica. Já a porfirina catiônica se ligou rapidamente a *C. albicans*, atingindo uma concentração máxima após 30 minutos de contato com o fungo resultando em uma redução de 5 log quando associada a luz. Outro estudo avaliando o potencial fotodinâmico antimicrobiano de zinco-ftalocianinas, catiônica e aniônica, observou que mesmo na concentração mais alta (6 μM) associada a uma dose de luz de 60 J/cm^2 , a ftalocianina aniônica não promoveu danos fototóxicos em suspensões de *C. albicans*, sendo que a catiônica resultou em completa inativação com dose de luz mais baixa⁵¹. Já para o MSSA e MRSA, observou-se que ambas as cepas foram completamente inativadas pela ftalocianina catiônica na concentração até 6 μM , sendo que para a ftalocianina aniônica, doses de luz maiores foram necessárias para causar redução de 3 a 4 log no crescimento do *S. aureus*⁵¹. Essa maior afinidade por fotossensibilizadores ou mesmo veículos com superfície de caráter catiônico é resultado da interação com a superfície externa da parede celular dos fungos e bactérias. A parede bacteriana Gram-positiva é relativamente espessa constituída basicamente por peptidoglicanos e negativamente carregada devido aos resíduos de ácido teicóico⁴². Ainda, a parede celular fúngica também possui uma carga residual negativa. Sendo assim, moléculas catiônicas possuem maior afinidade pela parede celular, facilitando o transporte ativo desses fármacos para o interior das células bacterianas e fúngicas^{27,51,74}. Além disso, como a parede celular fornece estrutura para célula dos micro-organismos além de proteção contra o meio externo, os fármacos devem ser capazes de atravessar essa barreira e atingir os compartimentos celulares internos a fim de promover danos celulares¹⁵. Dessa forma, as cargas superficiais são de extrema importância para resultados efetivos na PDT, e as NE possibilitaram a

alteração nas propriedades do FS, como a carga da superfície, o que resultou em melhores efeitos fotodinâmicos.

Essa menor afinidade do veículo aniônico pelas células bacterianas e fúngicas foi influenciada pela remoção do excesso extracelular do fármaco. Devido às características ópticas da NE, houve a necessidade de remover a mesma após o período de pré-incubação de 30 minutos, pois a sua opacidade dificultou a distribuição da luz pela suspensão dos micro-organismos. Sendo assim, somente o fármaco absorvido pelas bactérias e fungos foi responsável pelos danos fototóxicos observados. A influência da absorção do FS pelo micro-organismo na efetividade da PDT foi avaliada em experimentos realizados na presença e ausência do fármaco durante a irradiação³¹. Grinholc et al.³¹ avaliaram o potencial da PDT em cultura planctônica de MSSA e MRSA utilizando uma protoporfirina que foi removida previamente a irradiação e observaram que o efeito bactericida foi reduzido com a remoção do fármaco. No estudo de Dahl et al.¹⁷ que avaliou os efeitos tóxicos da PDT com curcumina em *S. aureus* foi observado que a remoção da solução de curcumina antes da irradiação mesmo após um período de pré-incubação de 90 minutos resultou em mínima redução da UFC/mL dessa bactéria demonstrando ser necessária a presença do FS durante a PDT. Dessa forma, o tipo de veiculação assim como as características do FS determinam a capacidade do mesmo ser absorvido pelo micro-organismo. Essa capacidade da CIAIFt veiculada em NE catiônica em ser absorvida pela a célula-alvo como demonstrado nos Capítulos 2 e 3 é importante, uma vez que restringe os danos fototóxicos às células que absorveram esse FS, sem causar efeitos adversos aos tecidos normais do hospedeiro.

Outro ponto interessante em nosso estudo é que os resultados de UFC/mL obtidos para a CIAIFt livre e NE catiônica foram semelhantes para suspensão planctônica de bactérias gram-positivas. Tsai et al.⁸⁰ avaliaram duas formas de encapsulamento (lipossomos e micelas poliméricas) de uma hematoporfirina na inativação de patógenos gram-positivos e compararam com sua forma livre. Os autores observaram que menores doses de FS foram necessárias para inativar as bactérias quando veiculadas por lipossomos e micelas em comparação com a solução salina. Entretanto, em concentrações mais altas da porfirina, as três formas de veiculação apresentaram o mesmo comportamento. Sendo assim, especula-se a partir dos resultados do Capítulo 3, que a concentração utilizada foi suficientemente alta,

resultando em comportamento semelhante da CIAIFt quando veiculada na NE catiônica ou livre.

Além do efeito da PDT com CIAIFt no valores de UFC/mL das suspensões planctônicas, também foi avaliado o efeito no metabolismo bacteriano e fúngico dessas suspensões utilizando o teste de XTT, o qual se baseia na redução do sal de tetrazolium pelo sistema de transporte de elétrons ativos em bactérias e pela enzima desidrogena em fungos⁶³. Essa avaliação foi realizada imediatamente após a PDT e permitiu observar o efeito inicial dessa terapia sobre os micro-organismos. Para o MSSA, ambas as NE e a CIAIFt livre quando associadas a luz resultaram em intensa redução do metabolismo celular, independente da dose de luz empregada. Já para o MRSA, a redução do metabolismo foi evidenciada para todas as veiculações somente quando associadas a maior fluência (50 J/cm^2), exceto para a ftalocianina diluída em DMSO, em que também observou-se redução de cerca de 96% associada a dose de luz de 25 J/cm^2 . Esses resultados revelam que a PDT causou uma alteração inicial no transporte de elétrons ativos da membrana celular responsáveis pela respiração bacteriana. Entretanto, essa alteração não foram suficientes para causar completa inativação dos micro-organismos em todas as associações de CIAIFt e luz, o que evidencia uma relação nem sempre direta dos resultados obtidos no teste XTT com os valores de CFU/mL. O mesmo foi observado nas suspensões planctônicas de *C. albicans*, onde foi verificado redução no metabolismo celular após a PDT com NE catiônica, em aproximadamente de 93%. Entretanto, pela contagem de colônias, observou-se redução de aproximadamente 3 log. Sendo assim, esses dados sugerem que os produtos gerados pela reação da PDT utilizando a CIAIFt veiculada nas NE catiônica foram capazes de causar alterações celulares que resultaram em redução da atividade mitocondrial inicial. Entretanto, essas alterações não foram suficientes para causar morte de todas as células, pois, quando em meio de cultura propício como o SDA após 48 horas, foi observado crescimento de algumas colônias. Ainda assim, foi observado que essas colônias apresentavam tamanho reduzido quando comparado ao controle negativo, demonstrando que a PDT com a NE catiônica resultou em alteração do processo de replicação celular e conseqüentemente no crescimento de colônias da *C. albicans*.

Os resultados do XTT também evidenciaram que a NE catiônica e a CIAIFt diluída em DMSO apresentaram toxicidade no escuro para o MSSA, MRSA e *C. albicans* quando em suspensão planctônica. A maior toxicidade de moléculas

catiônicas, seja o próprio FS ou mesmo o veículo utilizado, já foi relatado anteriormente na literatura^{5,41,65}. Kussovski et al.⁴¹ ao avaliar o efeito de ftalocianinas catiônicas em bactérias gram-negativa, observaram inativação completa da *Aeromonas* com concentração acima de 2 μM com uma das ftalocianinas avaliadas. No estudo de Bourré et al.⁵, a porfirina em concentrações acima de 1 μM quando conjugada a um peptídeo também foi tóxica, reduzindo cerca de 3 a 6 log o número de UFC/mL das espécies Gram-positivas, como o *S. aureus*. Essa maior toxicidade de moléculas catiônicas está relacionada ao seu potencial de se ligar mais rapidamente e alterar as propriedades da membrana plasmática dos micro-organismos. Apesar de ter sido observada uma redução estatisticamente significante do metabolismo dos micro-organismos avaliados quando em contato com a NE-catiônica e CIAIFt livre, na avaliação pela contagem de colônias (CFU/mL) não foi evidenciada diferenças entre o grupo controle negativo e o grupo controle das veiculações.

A fim de verificar os possíveis efeitos na membrana plasmática da *C. albicans* promovidos pela CIAIFt, as suspensões celulares fúngicas após a PDT foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (PI), um marcador nuclear que penetra exclusivamente nas células que têm a membrana celular danificada. Os resultados indicaram que para todas as veiculações avaliadas, a associação da ftalocianina com luz resultou em aumento na porcentagem de células marcadas com PI. O grupo que foi completamente inativado (CIAIFt livre associada a dose de luz de 100 J/cm^2) apresentou a maior porcentagem de células PI positivas. O estudo de Giroldo et al.²⁸ também observou danos a membrana citoplasmática de fungos utilizando o corante SYTOX Green e espectrofluorômetro. Esses autores verificaram um aumento de duas vezes na fluorescência do grupo submetido a PDT com azul de metileno quando comparado ao controle, sendo que nas mesmas condições houve redução de 50% do CFU/mL. No presente estudo, enquanto a porcentagem de células marcadas por PI para o grupo controle foi de cerca 2%, a porcentagem para os grupos da NE catiônica e CIAIFt livre foi de 34 e 49%, respectivamente. Dessa forma, os resultados da citometria demonstram que a membrana plasmática foi alvo das espécies reativas produzidas pela reação da PDT e confirmam os melhores resultados para os grupos da NE catiônica e CIAIFt livre com maior número de células PI positivas, maiores reduções no metabolismo celular e na determinação de CFU/mL.

A investigação do efeito antimicrobiano da PDT em biofilmes é de extrema importância, uma vez que é a forma mais comum de organização dos microrganismos *in vivo*¹¹. Além disso, devido a suas características como a presença de matriz polimérica extracelular, os biofilmes possuem maior resistência a penetração de agentes antimicrobianos e conseqüentemente aos fármacos fotossensíveis³⁸. Na presente pesquisa, a utilização de nanoemulsões teve como objetivo aumentar a estabilidade do fármaco e permitir maior penetração da CIAIFt no biofilme. De acordo com os resultados obtidos, a NE catiônica associada a dose de luz de 100 J/cm² apresentou os melhores resultados para os biofilmes fúngicos promovendo redução de cerca de 70% do metabolismo celular. Para os biofilmes bacterianos, a CIAIFt veiculada na NE catiônica também apresentou os melhores resultados, reduzindo cerca de 80% o metabolismo celular dos biofilmes de MSSA e de 76,5% os de MRSA. O estudo de Mantareva et al.⁵⁰ demonstrou que a silício-ftalocianina (SiPc) e germânio-ftalocianina (GePc) apresentaram uma penetração incompleta nos biofilmes de *C. albicans*, sendo que somente a SiPc promoveu redução significativa do CFU/mL quando utilizou-se uma dose de luz 150 J/cm² fracionada em três vezes. Estudo recente avaliou dois diferentes tipos de gálio-ftalocianinas (GaPc) catiônicas quanto ao potencial fotodinâmico antimicrobiano em biofilmes de bactérias gram-positivas e negativas e fungos. Os biofilmes foram formados pelo período de 18 horas, caracterizando um biofilme em fase intermediária e depois foram submetidos a PDT com 6 µM de GaPc irradiados por 50 J/cm². Observou-se completa inativação de biofilme fúngico e redução máxima de 1 a 2 log na UFC/mL para os biofilmes bacterianos. Os autores sugeriram que devido ao maior tempo necessário para replicação das células fúngicas, o período de 18 horas resultou em menor número de células para um biofilme fúngico quando comparado ao bacteriano, o qual por esse motivo foi mais resistente. Ainda que não tenha sido observada completa redução do metabolismo dos biofilmes, a PDT com CIAIFt encapsulada em NE catiônica apresentou-se como uma possibilidade uma vez que reduziu significativamente o metabolismo celular bacteriano e fúngico dos biofilmes. Além disso, sabe-se que o oxigênio singlete, produto da reação fotodinâmica, atua também nos polissacarídeos que compõem a matriz extracelular⁵⁷, o que pode levar a uma ruptura dessa estrutura facilitando a ação de outros fármacos quando utilizados em associação com a PDT.

Como demonstrado pela microscopia confocal, foram observados diferentes padrões de penetração da CIAIFt no interior dos biofilmes com os veículos

avaliados. A CIAIFt livre apresentou maior fluorescência ao redor e no interior das hifas do que das leveduras. Essa maior suscetibilidade das hifas à PDT também foi observada por Jackson et al.³³ e foi atribuída as alterações celulares ocorridas durante a transformação da levedura a hifa. Além disso, observou-se que as camadas mais superficiais do biofilme apresentaram fluorescência mais intensa, enquanto que a camada basal apresenta-se com menor intensidade, sugerindo que a flatocianina livre não penetrou efetivamente no interior dos biofilmes. Para a NE- catiônica, uma melhor distribuição do veículo foi observada entre hifas e leveduras, o que explica sua maior eficiência em reduzir o metabolismo dos biofilmes. Entretanto, assim como observado para o fármaco livre, as porções mais profundas dos biofilmes não foram sensibilizados como as camadas superficiais, demonstrando a dificuldade de penetração desses veículos no interior da estrutura dos biofilmes. As imagens de microscopia confocal obtidas após a aplicação da NE- aniônica, revelam intensa fluorescência nas camadas basais dos biofilmes de *C. albicans*, indicando que esse veículo foi capaz de penetrar mais profundamente no interior dessa estrutura. Entretanto, também foi observada ausência de fluorescência no interior e ao redor das leveduras e hifas, sugerindo que as células fúngicas não absorveram a ftalocianina veiculada por NE-aniônica. Dessa forma, essas imagens da microscopia confocal complementaram os resultados obtidos no teste XTT, onde não foi observada redução do metabolismo dos biofilmes de *C. albicans* quando se utilizou a veiculação aniônica para a CIAIFt.

Assim, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, verificou-se o efeito fotodinâmico da CIAIFt foi dependente da veiculação do fármaco, da carga da veiculação e da dose de luz empregada. A CIAIFt encapsulada na NE catiônica apresentou resultados promissores na inativação de *C. albicans*, MSSA e MRSA quando em culturas planctônicas e biofilmes. Esse tipo de veiculação oferece maior estabilidade para o fármaco em sua aplicação clínica.



5 Conclusão

5 Conclusão

Com base nas condições experimentais, e considerando as limitações do presente estudo, foi possível concluir que:

1. A associação de 5, 10 e 20 μM de curcumina com 18, 25 e 37,5 J/cm^2 de luz promoveu a completa inviabilização de uma cepa ATCC de *S. aureus* susceptível à meticilina (MSSA) em suspensões planctônicas.

2. Somente a associação de 20 μM de curcumina com 37,5 J/cm^2 de luz promoveu a completa inviabilização de uma cepa ATCC de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) em suspensões planctônicas.

3. O protocolo utilizado para inativação do MRSA reduziu significativamente o metabolismo de uma cultura celular de fibroblastos, em cerca de 80%.

4. O efeito fotodinâmico antimicrobiano da cloro-alumínio ftalocianina foi influenciado diretamente pelo tipo de veículo utilizado (livre ou em NE), carga superficial das NE e dose de luz empregada.

5. A CIAIFt livre inativou completamente suspensões planctônicas do fungo *C. albicans* quando associada a 100 J/cm^2 , e nesses mesmos parâmetros causou redução do metabolismo das células planctônicas em 99,5%. Para as cepas bacterianas, também foi observada completa inativação do MSSA e MRSA quando associou-se a CIAIFt livre às doses de luz de 25 e 50 J/cm^2 , respectivamente.

6. A CIAIFt veiculada na nanoemulsão catiônica quando associada a dose de luz de 100 J/cm^2 causou redução significativa tanto de UFC/mL (~ 3.1 log) quanto do metabolismo celular em cerca de 92,3% do fungo *C. albicans*. Para as bactérias, a NE catiônica inativou completamente as suspensões planctônicas do MSSA e MRSA quando associada às doses de luz de 25 e 50 J/cm^2 , respectivamente.

7. Para os biofilmes de *C. albicans*, a CIAIFt veiculada na nanoemulsão catiônica apresentou os melhores resultados, reduzindo o metabolismo do biofilmes em 70%. Da mesma forma, a NE catiônica reduziu em cerca de 80 e 76% o metabolismo dos biofilmes de MSSA e MRSA, respectivamente.

8. A CIAIFt veiculada na nanoemulsão aniônica não apresentou atividade antimicrobiana para o fungo *C. albicans* e MRSA mesmo quando associada

as maiores doses de luz avaliadas. Por outro lado, para o MSSA, a NE aniônica resultou em reduções de 2 e 4 log quando irradiada pela dose de luz de 15 e 25 J/cm², respectivamente.



6 Referências

6 Referências*

1. Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy--state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008; 5:19-28.
2. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc.* 1995; 61: 199-200, 203-5.
3. Biel M. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem and Photobiol.* 2007; 83:1063-8.
4. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
5. Bourré L, Giuntini F, Eggleston IM, Mosse CA, MacRobert AJ, Wilson M. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochem Photobiol Sci.* 2010; 9: 1613-20.
6. Bredell M, Besic E, Maake C, Walt H. The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: a short review. *J Photochem Photobiol B.* 2010;101:185-90.
7. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4: 523-30.
8. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1859-63.
9. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1776: 86-107.

*De acordo com estilo Vancouver. Disponível no site:
[HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

10. Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4288-95.
11. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001; 183: 5385-94.
12. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60:1627-37.
13. Coogan MM, Fidel PL Jr, Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res.* 2006; 19: 130-8.
14. Copper MP, Triesscheijn M, Tan IB, Ruevekamp MC, Stewart FA. Photodynamic therapy in the treatment of multiple primary tumours in the head and neck, located to the oral cavity and oropharynx. *Clin Otolaryngol.* 2007; 32: 185-9.
15. Cormick MP, Alvarez MG, Rovera M, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2009; 44:1592-99.
16. da Volta Soares M, Oliveira MR, dos Santos EP, de Brito Gitirana L, Barbosa GM, Quaresma CH, Ricci-Júnior E. Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 227-38.
17. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol.* 1989; 151: 183-5.
18. Daziano JP, Humeau L, Henry M, Mannoni P, Chanon M, Chabannon C, Julliard M. Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B.* 1998; 43: 128-35.
19. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2329-35.
20. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-93.
21. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163: 1-12.

22. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011; 54: 123-30.
23. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87: 895-903.
24. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr*. 2010; 103: 1545-57.
25. Esposito P, Varvara G, Caputi S, Perinetti G. Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. *Int Endod J*. 2003; 36: 599-603.
26. Fadel M, Kassab K, Fadeel DA. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers Med Sci*. 2010; 25: 283-72.
27. Ferro S, Ricchelli F, Monti D, Mancini G & Jori G. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 1026-34.
28. Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009; 24: 109-12.
29. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 637-42.
30. Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *J Photochem Photobiol B*. 2008; 90: 57-63.

31. Grinholc M, Zawacka-Pankau J, Gwizdek-Wiśniewska A, Bielawski KP. Evaluation of the role of the pharmacological inhibition of *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pumps and the variable levels of the uptake of the sensitizer in the strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to PPAArg(2)-based photodynamic inactivation. *Photochem Photobiol.* 2010; 86: 1118-26.
32. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie.* 2009; 64: 666-73.
33. 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.
34. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti 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.
35. Karakullukcu B, van Oudenaarde K, Copper MP, Klop WM, van Veen R, Wildeman M, et al. Photodynamic therapy of early stage oral cavity and oropharynx neoplasms: an outcome analysis of 170 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011; 268: 281-8.
36. Kirszberg C, Rumjanek VM, Capella MA. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 56: 659-65.
37. Kolarova H, Lenobel R, Kolar P, Strnad M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. *Toxicol In Vitro.* 2007; 21: 1304-6.
38. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86: 694-707.
39. Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Gebremedhin S, Düzgüneş N. Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2010; 97: 413-7.
40. Kurien BT, Scofield RH. Heat-solubilized curcumin should be considered in clinical trials for increasing bioavailability. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:747.

41. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett. 2009; 294: 133-40.
42. Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. J Appl Microbiol. 2002; 92 Suppl: 46S-54S.
43. Lee D, Howlett J, Pratten J, Mordan N, McDonald A, Wilson M, Ready D. Susceptibility of MRSA biofilms to denture-cleansing agents. FEMS Microbiol Lett. 2009; 291: 241-46.
44. Longo JP, Lozzi SP, Simioni AR, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. Photochem Photobiol B. 2009; 94: 143-6.
45. Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fátima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. Lasers Med Sci 2011. In press.
46. Loveday HP, Pellowe CM, Jones SR, Pratt RJ. A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (Subgroup A). J Hosp Infect. 2006; 63 Suppl 1: S45-70.
47. Machado AH, Moraes KC, Pacheco Soares C, Junior MB, da Silva NS. Cellular changes after photodynamic therapy on HEp-2 cells using the new ZnPcBr(8) phthalocyanine. Photomed Laser Surg. 2010; 28 Suppl 1: S143-9.
48. Maeda Y, Kenny F, Coulter WA, Loughrey A, Nagano Y, Goldsmith CE, et al. Bactericidal activity of denture-cleaning formulations against planktonic health care-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control. 2007; 35: 619-22.
49. Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 1542-52.

50. Mantareva V, Angelov I, Kussovski V, Dimitrov R, Lapok L, Wöhrle D. Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur J Med Chem.* 2011; 46: 4430-40.
51. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Borisova E, Avramov L, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15: 4829-35.
52. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E, et al. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10: 91-102.
53. Martins CV, Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 337-9.
54. Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111: 71-7.
55. Mizuno K, Zhiyentayev T, Huang L, Khalil S, Nasim F, Tegos GP, et al. Antimicrobial photodynamic therapy with functionalized fullerenes: quantitative structure-activity relationships. *J Nanomed Nanotechnol.* 2011; 2: 1-9.
56. Monfrecola G, Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabro G, Santoianni P. In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 419-22.
57. Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 2012; 116: 1-10.
58. 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.

59. Primo FL, Bentley MV, Tedesco AC. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2008; 8: 340-7.
60. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol C.* 2009; 10: 81-95.
61. Raab OZ. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Z Biol.* 1900; 39: 524-46.
62. Ragàs X, Sánchez-García D, Ruiz-González R, Dai T, Agut M, Hamblin MR, et al. Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy. *J Med Chem.* 2010; 53: 7796-803.
63. Roslev P, King GM. Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59: 2891-6.
64. Rossetti FC, Lopes LB, Carollo AR, Thomazini JA, Tedesco AC, Bentley MV. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release.* 2011; 155: 400-8.
65. Schwiertz J, Wiehe A, Gräfe S, Gitter B, Epple M. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria. *Biomaterials.* 2009; 30: 3324-31.
66. Séguier S, Souza SL, Sverzut AC, Simioni AR, Primo FL, Bodineau A, et al. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 101: 348-54.
67. Seneviratne CJ, Silva WJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Arch Oral Biol.* 2009; 54:1052- 60.
68. Sharma M, Manoharlal R, Puri N, Prasad R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. *Biosci Rep.* 2010; 30: 391-404.
69. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 1955-68.

70. Shen L, Ji HF, Zhang HY. A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photosensitizing mechanisms of the pigment. *Chem Physics Letters*. 2005; 409: 300-3.
71. Simor AE, Phillips E, McGeer A, Konvalinka A, Loeb M, Devlin HR, et al. Randomized controlled trial of chlorhexidine gluconate for washing, intranasal mupirocin, and rifampin and doxycycline versus no treatment for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 178-85.
72. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001; 50: 940-6.
73. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B*. 2006; 83: 34-8.
74. Spesia MB, Rovera M, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur J Med Chem*. 2010; 45: 2198-205.
75. Strakhovskaya MG, Antonenko YN, Pashkovskaya AA, Kotova EA, Kireev V, Zhukhovitsky VG, et al. Electrostatic binding of substituted metal phthalocyanines to enterobacterial cells: its role in photodynamic inactivation. *Biochemistry (Mosc)*. 2009; 74: 1305-14.
76. Sumi Y, Miura H, Michiwaki Y, Nagaosa S, Nagaya M. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Arch Gerontol Geriatr*. 2007; 44: 119-24.
77. Szpakowska M, Lasocki K, Grzybowski J, Graczyk A. Photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut(2)-Arg(2)) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacol Res*. 2001; 44: 243-6.
78. Terpenning M. Geriatric oral health and pneumonia risk. *Clin Infect Dis*. 2005; 40: 1807-10.
79. Tønnesen HH, Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci*. 1987; 76: 371-3.

80. Tsai T, Yang YT, Wang TH, Chien HF, Chen CT. Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg Med.* 2009; 41: 316-22.
81. van Rijen MM, Kluytmans JA. New approaches to prevention of staphylococcal infection in surgery. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21: 380-4.
82. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 13-28.
83. Wang Y, Lu Z, Wu H, Lv F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 2009; 136:71-4.
84. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection (PAD) used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent.* 2006; 34: 363-71.
85. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22: 354-7.
86. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144: 274-8.
87. Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE, He YY. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 241:163-72.



7 Apêndice

7 Apêndice

Nesta seção estão apresentados os resultados originais obtidos por meio das metodologias empregadas nos Capítulos 1, 2 e 3. Além disso, também estão descritas as análises utilizadas para possibilitar a posterior interpretação dos resultados. A descrição foi dividida em três partes principais, de acordo com o capítulo onde os resultados estão inseridos. A sequência utilizada para apresentação dos resultados, dentro de cada capítulo, está de acordo com a sequência adotada no respectivo artigo.

7.1 Capítulo 1

A- Avaliação de diferentes concentrações de curcumina sobre células planctônicas de MSSA

Inicialmente, foram avaliadas diferentes concentrações de curcumina (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 μ M) em associação com diferentes doses de luz (18,0; 25,5 e 37,5 J/cm²) sobre suspensões planctônicas de MSSA (condições denominadas de C+L+). As mesmas concentrações do FS foram avaliadas sem iluminação para se determinar o possível efeito tóxico da curcumina isoladamente (condições denominadas de C+L-), assim como as mesmas doses de luz foram avaliação sem a presença do FS para se determinar o possível efeito da luz isoladamente (condições denominadas C-L+). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem FS nem luz (C-L-). Para cada condição avaliada, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em duas diferentes ocasiões de experimentos.

Para avaliação da viabilidade celular das amostras, foram obtidas diluições seriadas das amostras, as quais foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Manitol Salt Agar. 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 a partir da fórmula:

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

Onde:

n = valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3)

q= volume (mL) pipetado em cada quadrante nas placas

Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais para o MSSA estão apresentados nas Tabelas A1 a A4. Como os valores de ufc/mL são extremamente elevados, estes foram transformados em logaritmo (de base 10) para a análise pretendida neste trabalho. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas nas Tabelas A5 a A8.

Tabela A1- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 18 J/cm². Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina						
0	0,1	0,5	1	5	10	20
6,06E+06	4,12E+05	1,52E+04	3,40E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4,94E+06	4,92E+05	1,22E+04	2,20E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5,44E+06	4,28E+05	1,34E+04	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6,40E+06	5,50E+05	1,48E+04	2,40E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6,40E+06	5,20E+05	1,26E+04	1,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabela A2- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 25,5 J/cm². Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina						
0	0,1	0,5	1	5	10	20
5,28E+06	5,88E+04	1,46E+04	8,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5,74E+06	1,72E+04	1,94E+04	4,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6,26E+06	9,82E+04	1,26E+04	4,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5,34E+06	5,88E+04	1,42E+04	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5,72E+06	3,80E+04	1,22E+04	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabela A3- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 37,5 J/cm². Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina						
0	0,1	0,5	1	5	10	20
6,14E+06	3,06E+04	1,26E+04	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
5,90E+06	3,00E+04	1,38E+04	1,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6,58E+06	3,46E+04	1,40E+04	1,80E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6,52E+06	3,42E+04	3,56E+04	8,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
4,84E+06	3,32E+04	2,38E+04	8,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Tabela A4- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais C+L- e C-L- para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina						
0	0,1	0,5	1	5	10	20
5,68E+06	5,28E+06	5,72E+06	5,90E+06	5,64E+06	5,46E+06	6,46E+06
5,28E+06	5,18E+06	5,14E+06	5,14E+06	6,46E+06	5,28E+06	6,04E+06
5,60E+06	5,18E+06	6,02E+06	6,44E+06	5,10E+06	5,58E+06	5,84E+06
6,68E+06	5,36E+06	7,22E+06	6,04E+06	6,04E+06	5,94E+06	5,46E+06
5,52E+06	6,04E+06	6,82E+06	5,24E+06	5,00E+06	5,98E+06	5,06E+06

Tabela A5- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 18 J/cm². Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina						
	0	0,1	0,5	1	5	10	20
Média	6,765	5,679	4,318	2,354	0,000	0,000	0,000
Mediana	6,782	5,692	4,301	2,344	0,000	0,000	0,000
Variância	0,002	0,003	0,002	0,014	0,000	0,000	0,000
Desvio padrão	0,049	0,054	0,043	0,119	0,000	0,000	0,000
Mínimo	6,694	5,615	4,279	2,207	0,000	0,000	0,000
Máximo	6,806	5,740	4,369	2,533	0,000	0,000	0,000

Tabela A6- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 25,5 J/cm². Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina						
	0	0,1	0,5	1	5	10	20
Média	6,753	4,669	4,158	1,692	0,000	0,000	0,000
Mediana	6,757	4,769	4,152	1,613	0,000	0,000	0,000
Variância	0,001	0,080	0,006	0,073	0,000	0,000	0,000
Desvio padrão	0,030	0,283	0,080	0,271	0,000	0,000	0,000
Mínimo	6,723	4,236	4,086	1,322	0,000	0,000	0,000
Máximo	6,797	4,992	4,288	2,004	0,000	0,000	0,000

Tabela A7- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de $37,5 \text{ J/cm}^2$, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina						
	0	0,1	0,5	1	5	10	20
Média	6,775	4,511	4,144	1,880	0,000	0,000	0,000
Mediana	6,788	4,521	4,140	1,908	0,000	0,000	0,000
Variância	0,003	0,001	0,001	0,118	0,000	0,000	0,000
Desvio padrão	0,054	0,028	0,033	0,343	0,000	0,000	0,000
Mínimo	6,685	4,477	4,100	1,322	0,000	0,000	0,000
Máximo	6,818	4,539	4,193	2,258	0,000	0,000	0,000

Tabela A8- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais C+L- e C-L- para o MSSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina						
	0	0,1	0,5	1	5	10	20
Média	6,758	6,732	6,788	6,758	6,750	6,751	6,760
Mediana	6,748	6,723	6,780	6,771	6,751	6,747	6,766
Variância	0,002	0,001	0,004	0,002	0,002	0,001	0,002
Desvio padrão	0,039	0,028	0,059	0,042	0,047	0,023	0,041
Mínimo	6,723	6,714	6,711	6,711	6,699	6,723	6,704
Máximo	6,825	6,781	6,859	6,809	6,810	6,777	6,810

Como o objetivo principal do estudo foi de verificar qual tratamento resultou em maior efetividade na inativação de MSSA, a análise inferencial a ser utilizada deveria possibilitar a comparação entre os grupos estudados. Inicialmente, os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram utilizados para a verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente ($\alpha = 0,05$). O resultado de ambos os testes indicou valores de probabilidade maiores que 0,05, confirmando que o conjunto dos dados atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Dessa forma, o teste estatístico empregado para comparação das médias dos grupos foi a Análise de Variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%.

O resultado da ANOVA está apresentado nas Tabela A9. É importante notar que o tratamento de PDT mediado por 5, 10 e 20 μM de curcumina resultou em

valores nulos de crescimento de colônias, e, por se tratar de valores iguais a zero, este grupo não foi inserido na análise inferencial.

Tabela A9- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos experimentais e controle do MSSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

ANOVA						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	81,0469407	3	27,0156469	1384,36026	0,000000	2,74819091
Colunas	132,480901	3	44,1603004	2262,90214	0,000000	2,74819091
Interações	46,8616700	9	5,20685223	266,814242	0,000000	2,02979207

A partir dos resultados obtidos pelo ANOVA, os valores de probabilidade encontrados indicaram haver diferença estatisticamente significativa em pelo menos uma das médias dos grupos. Por isso, foi necessária a utilização de um teste de comparações múltiplas das médias (post hoc). O teste selecionado foi o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, e os resultados estão apresentados nas Tabela A10.

Tabela A10- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos experimentais e controle por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre colunas, enquanto letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre linhas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

<i>Doses de luz</i> (<i>J/cm²</i>)	<i>Concentrações de Curcumina (µM)</i>											
	0	0.1	0.5	1	5	10	20					
0	6,76 ^{Aa}	6,73 ^{Aa}	6,79 ^{Aa}	6,76 ^{Aa}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]					
	0,04	0,03	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00					
18	6,76 ^{Aa}	5,68 ^{Bb}	4,32 ^{Bc}	2,35 ^{Bd}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]					
	0,05	0,05	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00					
25,5	6,75 ^{Aa}	4,67 ^{Cb}	4,16 ^{Cc}	1,69 ^{Cd}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]					
	0,03	0,28	0,08	0,27	0,00	0,00	0,00					
37,5	6,78 ^{Aa}	4,51 ^{Cb}	4,14 ^{Cc}	1,88 ^{Cd}	0,00 [*]	0,00 [*]	0,00 [*]					
	0,05	0,03	0,03	0,34	0,00	0,00	0,00					

* Indica inativação completa

B- Avaliação de diferentes concentrações de curcumina sobre células planctônicas de MRSA

A partir dos resultados obtidos para a cepa de MSSA, foram selecionados os melhores parâmetros para utilização na cepa resistente (MRSA). Assim, foram avaliadas as maiores concentrações de curcumina (5; 10 e 20 μM) em associação com a maior dose de luz ($37,5 \text{ J/cm}^2$) sobre suspensões planctônicas de MRSA. As condições experimentais foram denominadas de forma similar àquela apresentada para o MSSA. Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais para o MSSA estão apresentados nas Tabelas A11 e A12.

Tabela A11- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MRSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de $37,5 \text{ J/cm}^2$. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina			
0	5	10	20
1,12E+08	3,16E+03	8,80E+02	0,00E+00
1,68E+09	9,60E+02	2,00E+01	0,00E+00
6,62E+09	3,54E+03	1,20E+02	0,00E+00
3,04E+09	6,60E+02	0,00E+00	0,00E+00
5,22E+09	6,00E+02	2,00E+01	0,00E+00

Tabela A12- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais C+L- e C-L- para o MRSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na ausência de luz. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina			
0	5	10	20
8,28E+09	9,02E+09	8,04E+09	1,68E+09
8,20E+09	6,50E+09	5,62E+09	4,12E+09
7,68E+09	7,90E+09	3,16E+09	7,92E+09
4,42E+09	9,10E+09	3,56E+09	2,62E+09
1,14E+10	1,02E+10	1,08E+10	7,18E+09

Como os valores de ufc/mL são extremamente elevados, estes foram transformados em logaritmo (de base 10) para a análise pretendida neste trabalho. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas nas Tabelas A13 a A14.

Tabela A13- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais C+L+ e C-L+ para o MRSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 37 J/cm^2 . Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina			
	0	5	10	20
Média	9,26	3,13	1,53	0,00
Mediana	9,48	2,98	1,32	0,00
Variância	0,51	0,14	1,18	0,00
Desvio padrão	0,71	0,37	1,09	0,00
Mínimo	8,05	2,78	0,00	0,00
Máximo	9,82	3,55	2,94	0,00

Tabela A14- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais C+L- e C-L- para o MRSA, de acordo com a concentração de curcumina utilizada. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina			
	0	5	10	20
Média	9,88	9,93	9,75	9,60
Mediana	9,91	9,96	9,75	9,61
Variância	0,02	0,01	0,05	0,08
Desvio padrão	0,15	0,07	0,23	0,29
Mínimo	9,65	9,81	9,50	9,23
Máximo	10,06	10,01	10,03	9,90

Os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram utilizados para a verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente ($\alpha = 0,05$). O resultado de ambos os testes indicou valores de probabilidade maiores que 0,05, confirmando que o conjunto dos dados atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Dessa forma, o teste estatístico empregado para comparação das médias dos grupos foi a Análise de Variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%. O resultado da ANOVA está apresentado nas Tabela A15. É importante notar que o tratamento de PDT mediado por $20 \mu\text{M}$ de curcumina resultou em valores nulos de crescimento de colônias, e, por se tratar de valores iguais a zero, este grupo não foi inserido na análise inferencial.

Tabela A15- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos experimentais e controle do MRSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Tratamento	394,331	6	65,722	231,2639	< 0,0001

A partir dos resultados obtidos pelo ANOVA, os valores de probabilidade encontrados indicaram haver diferença estatisticamente significativa em pelo menos uma das médias dos grupos. Por isso, foi necessária a utilização de um teste de comparações múltiplas das médias (post hoc). O teste selecionado foi o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, e os resultados estão apresentados na Tabela A16.

Tabela A16- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos experimentais e controle do MRSA por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

<i>Doses de luz (J/cm²)</i>	<i>Concentrações de Curcumina (µM)</i>							
	0		5		10		20	
0	9,886	a	9,928	a	9,748	a	9,604	a
37,5	9,26	a	3,13	b	1,53	c	0	*

* Indica inativação completa

C- Avaliação de diferentes concentrações de curcumina sobre cultura de fibroblastos

A partir dos resultados obtidos para as cepas bacterianas, foram selecionados os parâmetros efetivos para inativação tanto do MSSA quanto do MRSA para utilização em cultura de fibroblastos L929. Assim, foram avaliadas as maiores concentrações de curcumina (5; 10 e 20 µM) em associação com a maior dose de luz (37,5 J/cm²) sobre essa linhagem celular. As condições experimentais foram denominadas de forma similar àquela apresentada para as bactérias. Os valores originais de absorvância obtidos pelo teste de MTT em todas as condições experimentais estão apresentados nas Tabelas A17 e A18.

Tabela A17- Valores originais de absorvância obtidos nas condições experimentais C+L+ e C-L+ para os fibroblastos L929, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na dose de luz de 37,5 J/cm². Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina			
0	5	10	20
0,273	0,071	0,091	0,048
0,266	0,084	0,073	0,055
0,240	0,099	0,075	0,051
0,243	0,064	0,056	0,065
0,265	0,060	0,057	0,026
0,247	0,111	0,048	0,042
0,360	0,144	0,112	0,098
0,341	0,126	0,071	0,097
0,307	0,091	0,073	0,072
0,284	0,096	0,104	0,058

Tabela A18- Valores originais de absorvância obtidos nas condições experimentais C+L- e C-L- para os fibroblastos L929, de acordo com a concentração de curcumina utilizada na ausência de luz. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Concentrações de Curcumina			
0	5	10	20
0,290	0,251	0,357	0,260
0,268	0,270	0,256	0,293
0,269	0,302	0,264	0,254
0,258	0,254	0,245	0,271
0,300	0,250	0,245	0,234
0,266	0,274	0,254	0,249
0,372	0,305	0,340	0,340
0,355	0,306	0,325	0,282
0,349	0,295	0,379	0,336
0,325	0,349	0,337	0,279

Os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram utilizados para a verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente ($\alpha = 0,05$). O resultado de ambos os testes indicou valores de probabilidade maiores que 0,05, confirmando que o conjunto dos dados atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Dessa forma, o teste estatístico empregado para comparação das médias dos grupos foi a Análise de Variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%. O resultado da ANOVA está apresentado nas Tabela A19.

Tabela A19- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos experimentais e controles dos fibroblastos L929. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Grupos	0,86	0,12	97,45	0,000000	7
Resíduos	0,07	0		0,000000	72

A partir dos resultados obtidos pelo ANOVA, os valores de probabilidade encontrados indicaram haver diferença estatisticamente significativa em pelo menos uma das médias dos grupos. Por isso, foi necessária a utilização de um teste de comparações múltiplas das médias (post hoc). O teste selecionado foi o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, e os resultados estão apresentados na Tabela A20.

Tabela A20- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos experimentais e controle dos fibroblastos L929 por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

<i>Doses de luz</i> <i>(J/cm²)</i>	<i>Concentrações de Curcumina (µM)</i>			
	0	5	10	20
0	0,3052 a	0,3002 a	0,2853 a	0,2826 a
	0,0133	0,0165	0,0100	0,0131
37,5	0,2798 a	0,0947 b	0,0760 b	0,0610 b
	0,0111	0,0085	0,0066	0,0073

7.2 Capítulo 2

A- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas as doses de luz de 50 e 100 J/cm² nos valores de UFC/mL das suspensões planctônicas de *C. albicans*

Inicialmente, foram avaliados diferentes veiculações (NE catiônica, aniônica e livre) contendo a CIAIFt em uma concentração de 31,8 µM em associação com diferentes doses de luz (50 e 100 J/cm²) sobre suspensões planctônicas de *C. albicans* (condições denominadas PDT). O FS nas suas diferentes formas de veiculação foi avaliado sem iluminação para se determinar o possível efeito da ftalocianina isoladamente (condições denominadas de C -NE, C +NE, C CIAIPc) assim como a maior dose de luz foi avaliada sem a presença do FS para se determinar o possível efeito da luz isoladamente (condições denominadas LC). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem FS nem luz (NC). Para cada condição avaliada, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em duas diferentes ocasiões de experimentos.

Para avaliação da viabilidade celular das amostras, foram obtidas diluições seriadas das amostras, as quais foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar contendo 5 µg/mL de cloranfenicol (SDA). 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 a partir da fórmula já citada anteriormente.

Os valores originais de ufc/mL obtidos já transformados em logaritmo (de base 10) em todas as condições experimentais para a *C. albicans* estão apresentados na Tabela A21. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas na Tabela A22.

Tabela A21- Valores originais de \log_{10} obtidos a partir dos valores de ufc/mL nas condições experimentais para a *C. albicans*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C - NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 50 -NE	PDT50 +NE	PDT 50 CIAIPc	PDT 100 -NE	PDT 100 +NE	PDT 100 CIAIPc
6,75	6,74	6,71	6,60	6,46	6,16	5,62	5,06	5,71	3,55	0
6,70	6,86	6,72	6,65	6,12	6,46	5,16	5,14	6,50	3,16	0
6,67	6,87	6,85	6,61	6,37	6,60	5,24	5,08	6,33	3,95	0
6,74	6,80	6,72	6,56	6,59	6,57	5,32	5,07	6,64	3,68	0
6,77	6,74	6,74	6,59	6,44	6,59	5,54	5,12	6,73	3,60	0
6,70	6,78	6,51	6,56	6,28	6,36	5,24	5,30	6,47	3,96	0
6,69	6,74	6,57	6,60	6,25	6,36	5,35	5,27	6,02	3,57	0
6,57	6,61	6,67	6,68	6,09	6,38	5,80	5,31	5,85	3,65	0
6,58	6,71	6,75	6,32	6,09	6,81	5,53	5,10	5,89	3,62	0
6,67	6,51	6,72	6,43	6,25	6,51	5,60	5,11	6,45	2,79	0

Tabela A22- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais da *C. albicans*, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc	PDT 100-NE	PDT 100+NE	PDT 100 CIAIPc
Média	6,68	6,74	6,70	6,56	6,29	6,48	5,44	5,16	6,26	3,55	0,00
Variância	0,004	0,012	0,009	0,012	0,029	0,032	0,043	0,010	0,130	0,120	0,000
Desvio padrão	0,07	0,11	0,09	0,11	0,17	0,18	0,21	0,10	0,36	0,35	0,00
Mediana	6,69	6,74	6,72	6,60	6,27	6,49	5,44	5,11	6,39	3,61	0,00
Mínimo	6,57	6,51	6,51	6,32	6,09	6,16	5,16	5,06	5,71	2,79	0,00
Máximo	6,77	6,87	6,85	6,68	6,59	6,81	5,80	5,31	6,73	3,96	0,00

Os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram utilizados para a verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente ($\alpha = 0,05$). O resultado de ambos os testes indicou valores de probabilidade menores que 0,05, confirmando que o conjunto dos dados não atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Dessa forma, o teste de Kruskal-Wallis, o qual se baseia no estudo dos s que os dados ocupam quando se leva em consideração a ordenação dos valores numéricos em função dos grupos delineados, foi utilizado, ao nível de significância de 5%. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado e rejeitou a hipótese nula (estatística $\chi^2 = 96,67$ com 10 graus de liberdade), que resultou em valor de $p < 10^{-16}$. Dessa forma, existem grupos com médias distintas entre si. Assim, utilizou-se o teste de comparações múltiplas dos postos médios, a fim de identificar

diferenças entre os grupos experimentais. Os dados estão apresentados na Tabela A23.

Tabela A23- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de ufc/mL das suspensões planctônicas de *C. albicans* submetidas às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de log (ufc/mL)	Comparações Múltiplas
NC	6,68	a
C -NE	6,74	a
C +NE	6,70	a
C CIAIPc	6,56	a,b
LC	6,29	b
PDT 50-NE	6,48	a,b
PDT 50+NE	5,44	c
PDT 50 CIAIPc	5,16	c
PDT 100-NE	6,26	b
PDT 100+NE	3,55	d
PDT 100 CIAIPc	0,00	e

B- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas as doses de luz de 50 e 100 J/cm² nos valores de absorbância obtidos pelo teste de XTT das suspensões planctônicas de C. albicans

As mesmas condições experimentais apresentadas para avaliação do efeito da PDT associando a ftalocianina ao LED nos valores de ufc/mL foram utilizadas para o teste de XTT. Os valores originais de absorbância obtidos pelo teste de XTT em todas as condições experimentais para a *C. albicans* estão apresentados na Tabela A24. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas nas Tabela A25.

Tabela A24- Valores originais de absorvância obtidos a partir do teste de XTT nas condições experimentais para as suspensões planctônicas de *C. albicans*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C - NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc	PDT 100-NE	PDT 100+NE	PDT 100 CIAIPc
0,845	0,889	0,374	0,311	0,388	0,431	0,051	0,025	0,299	0,01	0
0,729	0,832	0,667	0,351	0,345	0,372	0,058	0	0,257	0,066	0
0,929	0,877	0,388	0,349	0,435	0,396	0,075	0,048	0,301	0,09	0
0,966	0,946	0,491	0,394	0,401	0,432	0,042	0	0,355	0,085	0
0,947	0,863	0,351	0,367	0,403	0,414	0,052	0	0,374	0,061	0,009
0,743	0,732	0,325	0,534	0,307	0,711	0,038	0,037	0,417	0,065	0,014
0,721	0,699	0,243	0,311	0,258	0,622	0,084	0,075	0,299	0,046	0,021
0,747	0,659	0,293	0,469	0,231	0,446	0,068	0,052	0,292	0,089	0
0,797	0,668	0,314	0,501	0,273	0,425	0,065	0,016	0,315	0,053	0
0,814	0,736	0,276	0,535	0,255	0,404	0,035	0,028	0,257	0,065	0

Tabela A25- Medidas de resumo de absorvância obtidos a partir do teste de XTT, calculadas para as amostras das condições experimentais das suspensões planctônicas de *C. albicans*, de acordo com a veiculação e dose de luz. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de resumo	NC	C - NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc	PDT 100-NE	PDT 100+NE	PDT 100 CIAIPc
Média	0,824	0,790	0,372	0,412	0,330	0,465	0,057	0,028	0,317	0,063	0,004
Variância	0,009	0,011	0,016	0,008	0,005	0,012	0,000	0,001	0,003	0,001	0,000
Desvio padrão	0,094	0,103	0,125	0,089	0,074	0,110	0,016	0,025	0,051	0,024	0,008
Mediana	0,806	0,784	0,338	0,381	0,326	0,428	0,055	0,027	0,300	0,065	0,000
Mínimo	0,721	0,659	0,243	0,311	0,231	0,372	0,035	0,000	0,257	0,010	0,000
Máximo	0,966	0,946	0,667	0,535	0,435	0,711	0,084	0,075	0,417	0,090	0,021

A fim de verificar, numérica e probabilisticamente, quais grupos foram semelhantes ou diferentes entre si, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, tendo em vista que não foram obtidas as características de normalidade das variáveis, tampouco a homogeneidade de variâncias entre grupos, o que impossibilitou o uso da ANOVA paramétrica. Considerando, portanto, a hipótese nula de igualdade de médias entre grupos, com nível de significância de 5%, o teste de Kruskal-Wallis foi realizado e observou-se valor de $p < 10^{-15}$ ($\chi^2 = 99,3034$ com 10 graus de liberdade), o que levou à clara rejeição da hipótese nula no nível de significância adotado, sendo necessária a complementação desse teste com o teste de comparações múltiplas dos postos médios (Tabela A26).

Tabela A26- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de absorvância das suspensões planctônicas de *C. albicans* submetidas às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de absorvância (nm)	Comparações Múltiplas
NC	0,824	a
C -NE	0,790	a
C +NE	0,372	b,c,d
C CIAIPc	0,412	b,c
LC	0,330	c,d
PDT 50-NE	0,465	b
PDT 50+NE	0,057	e
PDT 50 CIAIPc	0,028	f
PDT 100-NE	0,317	d
PDT 100+NE	0,063	e
PDT 100 CIAIPc	0,004	g

C- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas as doses de luz de 50 e 100 J/cm² na porcentagem de marcação de células pelo fluorocromo iodeto de propídeo das suspensões planctônicas de C. albicans

As mesmas condições experimentais apresentadas para avaliação do efeito da PDT associando a ftalocianina ao LED nos valores de ufc/mL e absorvância foram utilizadas para a citometria de fluxo. Os valores originais obtidos pela citometria de fluxo em todas as condições experimentais para a *C. albicans* estão apresentados na Tabela A27.

Tabela A27- Valores originais obtidos pela citometria de fluxo nas condições experimentais para as suspensões plactônicas de *C. albicans*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

GRUPOS	% de eventos	número de eventos	% marcação por IP	número de células marcadas por IP
NC	98,2%	9825	2,10%	207
NC	98,80%	9884	2,20%	212
NC	98,40%	9836	1,10%	114
NC	98,90%	9894	2,00%	200
NC	98,30%	9826	2,30%	234
C -NE	97,60%	9759	3,20%	308
C -NE	98,00%	9796	2,20%	220
C -NE	97,60%	9764	3,20%	318
C -NE	97,60%	9758	2,70%	266
C -NE	98,2%	9819	2,00%	203
C +NE	63,80%	6385	11,50%	1151
C +NE	65,00%	6498	17,10%	1708
C +NE	69,60%	6955	10,00%	958
C +NE	69,20%	6921	12,40%	1240
C +NE	75,8%	7580	11,30%	1132
C CIAIPc	99,50%	9952	1,70%	170
C CIAIPc	99,90%	9989	2,20%	220
C CIAIPc	99,90%	9998	1,60%	160
C CIAIPc	99,90%	9997	5,70%	572
C CIAIPc	99,90%	9997	4,20%	427
LC	94,80%	9483	1,90%	193
LC	98,40%	9838	2,70%	268
LC	98,00%	9797	2,1%	209
LC	95,80%	9576	1,50%	151
LC	98,00%	9795	2,20%	221
PDT 50-NE	97,60%	9760	5,60%	562
PDT 50-NE	98,40%	9841	7,20%	719
PDT 50-NE	98,30%	9828	5,60%	560
PDT 50-NE	98,00%	9797	9,70%	970
PDT 50-NE	98,00%	9799	7,60%	764
PDT 50 +NE	72%	7191	19,40%	1941
PDT 50 +NE	71,10%	7110	24,40%	2441
PDT 50 +NE	69,60%	6959	21,10%	2107
PDT 50 +NE	66,70%	6671	29,50%	2950
PDT 50 +NE	62,80%	6283	20,00%	2005
PDT 50 CIAIPc	99,90%	9993	10,70%	1071
PDT 50 CIAIPc	99,90%	9994	13,00%	1296
PDT 50 CIAIPc	99,90%	9998	10,80%	1085

PDT 50 CIAIPc	99,90%	9996	10,30%	1034
PDT 50 CIAIPc	99,90%	9997	13,80%	1384
PDT 100-NE	98,80%	9876	10,30%	1031
PDT 100-NE	98,00%	9802	9,60%	959
PDT 100-NE	97,40%	9740	8,60%	855
PDT 100-NE	97,00%	9702	7,90%	792
PDT 100-NE	98,20%	9821	8,90%	886
PDT 100+NE	75,80%	7575	36,00%	3604
PDT 100+NE	82,70%	8268	33,60%	3361
PDT 100+NE	74,60%	7461	33,70%	3370
PDT 100+NE	77,40%	7741	33,70%	3369
PDT 100+NE	62,50%	6251	33,00%	3300
PDT 100 CIAIPc	99,70%	9970	51,20%	5124
PDT 100 CIAIPc	99,90%	9996	47,20%	4724
PDT 100 CIAIPc	99,70%	9968	53,50%	5348
PDT 100 CIAIPc	99,90%	9997	47,90%	4788
PDT 100 CIAIPc	99,90%	9999	44,60%	4461

Os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram utilizados para a verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente ($\alpha = 0,05$). O resultado de ambos os testes indicou valores de probabilidade maiores que 0,05, confirmando que o conjunto dos dados atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Dessa forma, o teste estatístico empregado para comparação das médias dos grupos foi a Análise de Variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%. A partir dos resultados obtidos pelo ANOVA, os valores de probabilidade encontrados indicaram haver diferença estatisticamente significativa em pelo menos uma das médias dos grupos. Por isso, foi necessária a utilização de um teste de comparações múltiplas das médias (post hoc). O teste selecionado foi o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, e os resultados estão apresentados nas Tabela A28.

Tabela A28- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos experimentais dos dados da citometria de fluxo para suspensões planctônicas de *C. albicans* por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de marcação por IP (%)	Teste de Tukey*
NC	1,94	a
C -NE	2,66	a
C +NE	12,46	b
C CIAIPc	3,08	a
LC	2,08	a
PDT 50-NE	7,14	b
PDT 50+NE	22,88	c
PDT 50 CIAIPc	11,72	b
PDT 100-NE	9,06	b
PDT 100+NE	34	d
PDT 100 CIAIPc	48,88	e

* letras iguais denotam médias consideradas estatisticamente semelhantes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

D- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas as doses de luz de 50 e 100 J/cm² nos valores de absorbância obtidos pelo teste de XTT dos biofilmes de C. albicans

Foram avaliados diferentes veiculações (NE catiônica, aniônica e livre) contendo a CIAIFt em uma concentração de 31,8 μ M em associação com diferentes doses de luz (50 e 100 J/cm²) sobre os biofilmes de *C. albicans* (condições denominadas PDT). O FS nas suas diferentes formas de veiculação foi avaliado sem iluminação para se determinar o possível efeito da ftalocianina isoladamente (condições denominadas de C -NE, C +NE, C CIAIPc) assim como a maior dose de luz foi avaliada sem a presença do FS para se determinar o possível efeito da luz isoladamente (condições denominadas LC). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem FS nem luz (NC). Para cada condição avaliada, foram realizadas dez repetições, distribuídas aleatoriamente em diferentes ocasiões de experimentos. Em todas as condições experimentais, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do sal de XTT. O resultado da reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro em 492nm. Os valores originais de absorbância obtidos em todas as condições experimentais estão

apresentados na Tabela A29. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas na Tabela A30.

Tabela A29- Valores originais de absorvância obtidos a partir do teste de XTT nas condições experimentais para os biofilmes de *C. albicans*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 50- NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc	PDT 100-NE	PDT 100+NE	PDT 100 CIAIPc
1,351	1,580	1,035	1,049	1,308	1,767	0,802	0,990	1,281	0,396	0,935
1,372	1,555	0,914	1,337	1,320	1,772	0,806	1,158	1,193	0,386	0,993
1,400	1,567	0,571	1,344	1,288	1,743	0,730	1,001	1,319	0,384	0,921
1,268	1,515	0,628	1,356	1,258	1,726	0,723	1,088	1,215	0,364	0,882
1,303	1,561	0,652	1,347	1,283	1,642	0,753	0,974	1,319	0,377	0,884
1,300	1,702	0,879	1,348	1,282	1,728	0,816	1,085	1,380	0,470	0,894
1,376	1,673	0,868	1,400	1,311	1,712	0,787	1,025	1,203	0,424	0,798
1,322	1,651	0,660	1,392	1,281	1,749	0,749	0,988	1,255	0,390	0,871
1,272	1,683	0,823	1,427	1,241	1,755	0,722	0,896	1,278	0,419	0,792
1,365	1,696	0,833	1,440	0,728	1,739	0,773	0,932	1,275	0,424	0,895

Tabela A30- Medidas de resumo de absorvância obtidos a partir do teste de XTT, calculadas para os biofilmes das condições experimentais da *C. albicans*, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc	PDT 100-NE	PDT 100+NE	PDT 100 CIAIPc
Média	1,33	1,62	0,79	1,34	1,23	1,73	0,77	1,01	1,27	0,40	0,89
Variância	0,002	0,005	0,022	0,012	0,032	0,001	0,001	0,006	0,003	0,001	0,004
Desvio padrão	0,05	0,07	0,15	0,11	0,18	0,04	0,04	0,08	0,06	0,03	0,06
Mediana	1,34	1,62	0,83	1,35	1,28	1,74	0,76	1,00	1,28	0,39	0,89
Mínimo	1,27	1,52	0,57	1,05	0,73	1,64	0,72	0,90	1,19	0,36	0,79
Máximo	1,40	1,70	1,04	1,44	1,32	1,77	0,82	1,16	1,38	0,47	0,99

Testes foram realizados para verificação de normalidade e homogeneidade de variâncias visando a realização de Análise de Variâncias, mas não foram detectadas as condições necessárias e portanto, foi escolhido o teste de Kruskal-Wallis. Sob a hipótese nula de igualdade de todas as médias, considerando o teste bilateral com $\alpha = 0,05$, obtivemos estatística $\chi^2 = 101,021$ com 10 graus de liberdade, indicando, assim, fortíssima evidência de que a hipótese nula não é conveniente, ou seja, que existe, pelo menos, um grupo com média distinta das demais (valor de $p < 0,0001$). Para complementar o Kruskal-Wallis, foi utilizado o teste de postos médios (Tabela A31).

Tabela A31- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de absorvância dos biofilmes de *C. albicans* submetidos às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de absorvância (nm)	Comparações Múltiplas
NC	1,33	a
C -NE	1,62	b
C +NE	0,79	c
C CIAIPc	1,34	a
LC	1,23	a,e
PDT 50-NE	1,73	d
PDT 50+NE	0,77	c
PDT 50 CIAIPc	1,01	g
PDT 100-NE	1,27	e
PDT 100+NE	0,40	f
PDT 100 CIAIPc	0,89	h

7.3 Capítulo 3

A- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas a diferentes doses de luz e nos valores de UFC/mL das suspensões planctônicas de MSSA e MRSA

Inicialmente, foram avaliados diferentes veiculações (NE catiônica, aniônica e livre) contendo a CIAIFt em uma concentração de 31,8 μM em associação com diferentes doses de luz (15 e 25 J/cm^2 para MSSA; e 25 e 50 J/cm^2 para o MRSA) sobre suspensões planctônicas das cepas de *S. aureus* (condições denominadas PDT). O FS nas suas diferentes formas de veiculação foi avaliado sem iluminação para se determinar o possível efeito da ftalocianina isoladamente (condições denominadas de C -NE, C +NE, C CIAIPc) assim como a maior dose de luz foi avaliada sem a presença do FS para se determinar o possível efeito da luz isoladamente (condições denominadas LC). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem FS nem luz (NC). Para cada condição avaliada, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em duas diferentes ocasiões de experimentos. Os valores originais de ufc/mL obtidos já transformados em logaritmo (de base 10) em todas as condições experimentais para MSSA e MRSA estão apresentados nas Tabelas A32 e A33.

Tabela A32- Valores originais de \log_{10} obtidos a partir dos valores de ufc/mL nas condições experimentais para a MSSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 15-NE	PDT 15+NE	PDT 15 CIAIPc	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc
6,71	7,04	7,15	5,30	6,55	4,72	2,08	1,30	3,79	0,00	0,00
6,86	6,92	7,28	5,92	6,58	4,95	1,91	0,00	2,94	0,00	0,00
6,77	6,91	6,99	5,70	6,58	5,26	1,76	0,00	2,14	0,00	0,00
6,88	7,04	7,09	5,76	6,49	4,93	1,76	1,30	2,51	0,00	0,00
6,68	7,08	7,24	5,88	6,52	4,82	2,08	1,30	2,68	0,00	0,00
7,00	7,22	7,52	6,35	6,89	4,19	1,85	0,00	2,34	0,00	0,00
7,11	6,82	7,17	6,40	6,94	4,19	2,21	1,30	1,76	0,00	0,00
6,71	6,68	7,36	6,26	6,72	4,23	2,08	1,30	1,91	0,00	0,00
6,86	6,96	6,64	6,55	6,97	4,16	2,06	0,00	1,85	0,00	0,00
6,77	6,95	7,66	6,52	6,72	4,75	1,61	0,00	2,11	0,00	0,00

Tabela A33- Valores originais de \log_{10} obtidos a partir dos valores de ufc/mL nas condições experimentais para a MRSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc
7,31	7,32	6,98	7,02	7,09	6,99	2,84	2,51	6,56	0,00	0,00
7,28	7,32	7,30	6,76	7,10	7,05	3,26	2,41	6,46	0,00	0,00
7,25	7,26	7,10	6,84	7,17	6,79	3,26	2,26	6,59	0,00	0,00
7,27	7,26	7,02	6,75	7,38	6,97	3,22	1,60	6,61	0,00	0,00
7,31	7,32	6,93	6,90	7,02	7,05	3,19	2,34	6,66	0,00	0,00
7,51	7,71	7,21	5,55	7,22	7,02	3,26	2,62	6,18	0,00	0,00
7,45	7,32	7,35	5,63	7,20	6,37	2,30	2,08	6,17	0,00	0,00
7,18	7,51	7,48	5,83	7,22	6,77	2,61	2,30	6,09	0,00	0,00
7,66	7,27	7,37	5,76	7,02	6,73	2,34	2,26	6,28	0,00	0,00
7,59	7,39	7,29	5,87	7,24	7,22	2,00	1,90	6,38	0,00	0,00

Procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas nas Tabelas A34 e A35.

Tabela A34- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais do MSSA, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 15-NE	PDT 15+NE	PDT 15 CIAIPc	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc
Média	6,84	6,96	7,21	6,06	6,70	4,62	1,94	0,65	2,40	0,00	0,00
Variância	0,019	0,022	0,080	0,171	0,033	0,157	0,036	0,470	0,380	0,000	0,000
Desvio padrão	0,14	0,15	0,28	0,41	0,18	0,40	0,19	0,69	0,62	0,00	0,00
Mediana	6,82	6,95	7,21	6,09	6,65	4,73	1,98	0,65	2,24	0,00	0,00
Mínimo	6,68	6,68	6,64	5,30	6,49	4,16	1,61	0,00	1,76	0,00	0,00
Máximo	7,11	7,22	7,66	6,55	6,97	5,26	2,21	1,30	3,79	0,00	0,00

Tabela A35- Medidas de resumo, em \log_{10} (ufc/mL), calculadas para as amostras das condições experimentais do MSSA, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc
Média	7,38	7,37	7,20	6,29	7,17	6,90	2,83	2,23	6,40	0,00	0,00
Variância	0,026	0,020	0,034	0,365	0,013	0,057	0,234	0,090	0,043	0,000	0,000
Desvio padrão	0,16	0,14	0,19	0,60	0,11	0,24	0,48	0,30	0,21	0,00	0,00
Mediana	7,31	7,32	7,25	6,31	7,18	6,98	3,02	2,28	6,42	0,00	0,00
Mínimo	7,18	7,26	6,93	5,55	7,02	6,37	2,00	1,60	6,09	0,00	0,00
Máximo	7,66	7,71	7,48	7,02	7,38	7,22	3,26	2,62	6,66	0,00	0,00

A fim de verificar, numérica e probabilisticamente quais são semelhantes ou diferentes entre si, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, tendo em vista que não foram obtidas as características de normalidade das variáveis, tampouco a homogeneidade de variâncias entre grupos, o que nos impossibilita realizarmos a ANOVA paramétrica. Considerando, portanto, a hipótese nula de igualdade de médias entre grupos, com nível de significância de 5%, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado e o valor de p obtido foi de $p < 10^{-15}$ ($\chi^2 = 99,3034$ com 10 graus de liberdade), o que levou a rejeição da hipótese nula no nível de significância adotado. Dessa forma, foi aplicado para ambas as cepas de *S. aureus* o teste de comparações múltiplas de postos médios (Tabelas A36 e A37).

Tabela A36- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de ufc/mL das suspensões planctônicas do MSSA submetidos às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de log (ufc/mL)	Comparações Múltiplas
NC	6,84	a
C -NE	6,96	a
C +NE	7,21	a
C CIAIPc	6,06	b
LC	6,70	a
PDT 15-NE	4,62	c
PDT 15+NE	1,94	d
PDT 15 CIAIPc	0,65	e
PDT 25-NE	2,40	d
PDT 25+NE	0,00	f
PDT 25 CIAIPc	0,00	f

Tabela A37- Resultado do teste do posto médio para comparações múltiplas dos valores de ufc/mL das suspensões planctônicas do MRSA submetidos às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de log (ufc/mL)	Comparações Múltiplas
NC	7,38	a
C -NE	7,37	a
C +NE	7,20	a
C CIAIPc	6,29	b
LC	7,17	a
PDT 25-NE	6,90	a,b
PDT 25+NE	2,83	c
PDT 25 CIAIPc	2,23	c
PDT 50-NE	6,40	d
PDT 50+NE	0,00	e
PDT 50 CIAIPc	0,00	e

B- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas as diferentes doses de luz nos valores de absorbância obtidos pelo teste de XTT das suspensões planctônicas de MSSA e MRSA

As mesmas condições experimentais apresentadas para avaliação do efeito da PDT associando a ftalocianina ao LED nos valores de ufc/mL foram utilizadas para o teste de XTT. Em todas as condições experimentais, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do sal de XTT. O resultado da reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro em 492nm. Os valores originais de absorbância obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados nas Tabelas A38 e A39. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas nas Tabelas A40 e A41.

Tabela A38- Valores originais de absorbância obtidos a partir do teste de XTT nas condições experimentais para as suspensões planctônicas de MSSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 15-NE	PDT 15+NE	PDT 15 CIAIPc	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc
0,65	0,76	0,19	0,142	0,87	0,109	0,186	0,047	0,063	0,031	0
0,67	0,71	0,40	0,098	0,86	0,259	0,093	0,021	0,204	0,051	0
0,64	0,76	0,27	0,13	0,70	0,402	0,000	0,035	0,054	0,000	0,047
0,55	0,84	0,23	0,154	0,78	0,229	0,047	0	0,077	0,130	0
0,65	0,80	0,08	0,091	0,87	0,503	0,000	0	0,029	0,049	0,051
0,57	0,85	0,13	0,118	0,60	0,321	0,027	0	0,012	0,000	0
0,61	0,86	0,07	0,047	0,73	0,355	0,141	0	0,000	0,000	0
0,55	0,90	0,10	0,182	0,80	0,381	0,035	0	0,025	0,000	0
0,61	0,92	0,32	0,018	0,62	0,167	0,014	0	0,019	0,005	0
0,74	0,82	0,17	0,126	0,83	0,279	0,000	0	0,031	0,000	0

Tabela A39- Valores originais de absorvância obtidos a partir do teste de XTT nas condições experimentais para as suspensões planctônicas de MRSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C - NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc
0,290	0,241	0,150	0,188	0,199	0,146	0,022	0,000	0,196	0,036	0,058
0,316	0,285	0,245	0,207	0,182	0,320	0,208	0,044	0,015	0,004	0,021
0,110	0,235	0,035	0,231	0,271	0,312	0,201	0,009	0,248	0,000	0,031
0,266	0,270	0,051	0,171	0,241	0,198	0,189	0,012	0,231	0,113	0,027
0,115	0,238	0,197	0,229	0,223	0,299	0,131	0,009	0,156	0,021	0,024
0,219	0,221	0,234	0,173	0,286	0,309	0,193	0,000	0,166	0,000	0,000
0,048	0,250	0,123	0,192	0,189	0,363	0,222	0,000	0,147	0,011	0,000
0,203	0,215	0,140	0,224	0,398	0,231	0,268	0,000	0,000	0,000	0,000
0,295	0,204	0,075	0,2	0,569	0,233	0,170	0,000	0,177	0,154	0,000
0,343	0,287	0,249	0,203	0,218	0,329	0,133	0,000	0,012	0,090	0,000

Tabela A40- Medidas de resumo de absorvância obtidos a partir do teste de XTT, calculadas para as amostras das condições experimentais do MSSA, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 15-NE	PDT 15+NE	PDT 15 CIAIPc	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc
Média	0,625	0,823	0,196	0,111	0,767	0,301	0,054	0,010	0,051	0,027	0,010
Variância	0,004	0,004	0,012	0,002	0,010	0,014	0,004	0,000	0,003	0,002	0,000
Desvio padrão	0,059	0,065	0,109	0,049	0,100	0,117	0,065	0,018	0,059	0,042	0,021
Mediana	0,628	0,829	0,183	0,122	0,791	0,300	0,031	0,000	0,030	0,003	0,000
Mínimo	0,548	0,712	0,074	0,018	0,603	0,109	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Máximo	0,740	0,924	0,397	0,182	0,873	0,503	0,186	0,047	0,204	0,130	0,051

Tabela A41- Medidas de resumo de absorvância obtidos a partir do teste de XTT, calculadas para as amostras das condições experimentais do MRSA, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc
Média	0,22	0,24	0,15	0,20	0,28	0,27	0,17	0,01	0,13	0,04	0,02
Variância	0,010	0,001	0,006	0,000	0,015	0,005	0,004	0,000	0,009	0,003	0,000
Desvio padrão	0,10	0,03	0,08	0,02	0,12	0,07	0,07	0,01	0,09	0,06	0,02
Mediana	0,24	0,24	0,15	0,20	0,23	0,30	0,19	0,00	0,16	0,02	0,01
Mínimo	0,05	0,20	0,04	0,17	0,18	0,15	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,34	0,29	0,25	0,23	0,57	0,36	0,27	0,04	0,25	0,15	0,06

Por não preencher os requisitos de normalidade e homogeneidade, não foi possível aplicar o teste ANOVA paramétrica para avaliação dos valores de XTT obtidos para os grupos experimentais em ambas às suspensões planctônicas das cepas bacterianas. Portanto, considerando o nível de significância $\alpha = 0,05$ (5%) e sob a igualdade de médias, como hipótese nula, obtivemos para o teste de Kruskal-Wallis estatística $\chi^2 = 94,5198$ com 10 graus de liberdade, de modo que foi rejeitada a hipótese de igualdade entre médias com valor de $p < 10^{-15}$. A fim de complementar os dados desse teste, foi utilizado comparações múltiplas dos postos médios (Tabelas A42 e A43).

Tabela A42- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de absorvância das suspensões planctônicas de MSSA submetidas às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de Absorvância (nm)	Comparações Múltiplas
NC	0,625	a
C -NE	0,823	b
C +NE	0,196	c
C CIAIPc	0,111	c
LC	0,767	a,b
PDT 15-NE	0,301	c
PDT 15+NE	0,054	d,e
PDT 15 CIAIPc	0,010	f
PDT 25-NE	0,051	d
PDT 25+NE	0,027	e
PDT 25 CIAIPc	0,010	f

Tabela A43- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de absorvância das suspensões planctônicas de MRSA submetidas às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de Absorbância (nm)	Comparações Múltiplas
NC	0,22	a,b
C -NE	0,24	a
C +NE	0,15	c,d
C CIAIPc	0,20	b,c
LC	0,28	a,b
PDT 25-NE	0,27	a
PDT 25+NE	0,17	c,d
PDT 25 CIAIPc	0,01	e
PDT 50-NE	0,13	d
PDT 50+NE	0,04	e
PDT 50 CIAIPc	0,02	e

C- Avaliação do efeito das diferentes veiculações da CIAIFt associadas as diferentes doses de luz nos valores de absorvância obtidos pelo teste de XTT dos biofilmes de MSSA e MRSA

Os mesmos grupos experimentais utilizados para as suspensões planctônicas bacterianas foram reproduzidos para os biofilmes do MSSA e MRSA. Para cada condição avaliada, foram realizadas dez repetições, distribuídas aleatoriamente em diferentes ocasiões de experimentos. Em todas as condições experimentais, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do sal de XTT. O resultado da reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro em 492nm. Os valores originais de absorvância obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados nas Tabelas A44 e A45. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). As principais medidas calculadas estão apresentadas na Tabela A46 e A47.

Tabela A44- Valores originais de absorbância obtidos a partir do teste de XTT nas condições experimentais para os biofilmes de MSSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 15-NE	PDT 15+NE	PDT 15 CIAIPc	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc
0,854	0,561	0,609	0,942	1,246	0,439	0,163	0,659	0,181	0,140	0,462
0,568	0,620	0,551	0,673	0,709	0,464	0,155	0,636	0,177	0,144	0,508
0,430	0,612	0,604	0,741	0,677	0,528	0,128	0,775	0,295	0,054	0,336
0,426	0,607	0,543	0,867	0,673	0,595	0,163	0,678	0,488	0,095	0,444
0,468	0,686	0,770	0,814	0,702	0,502	0,179	0,707	0,496	0,046	0,337
0,877	0,527	0,203	0,718	0,673	0,800	0,262	0,766	0,374	0,097	0,459
0,689	0,534	0,128	0,632	0,896	0,600	0,184	0,861	0,257	0,070	0,435
0,633	0,519	0,195	0,749	0,689	0,760	0,173	0,510	0,340	0,066	0,363
0,564	0,496	0,156	0,705	0,726	0,709	0,174	0,998	0,364	0,042	0,544
0,533	0,717	0,218	0,746	0,812	0,858	0,111	0,744	0,446	0,040	0,430

Tabela A45- Valores originais de absorbância obtidos a partir do teste de XTT nas condições experimentais para os biofilmes de MRSA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc
0,714	0,749	0,422	0,894	1,191	0,615	0,173	0,991	0,816	0,109	0,58
0,590	0,714	0,323	1,105	0,817	0,399	0,149	0,886	0,686	0,107	0,412
0,422	0,578	0,581	1,245	0,900	0,575	0,134	0,987	0,899	0,095	0,622
0,471	0,608	0,256	1,259	0,934	0,633	0,129	1,011	0,977	0,087	0,364
0,403	0,929	0,801	1,292	0,965	0,649	0,156	0,924	0,811	0,08	0,427
0,524	0,541	0,490	0,939	0,930	0,761	0,152	0,779	0,837	0,077	0,465
0,390	0,903	0,602	0,905	0,745	1,068	0,129	0,906	0,948	0,81	0,685
0,570	0,770	0,721	1,167	0,889	0,908	0,121	0,624	0,975	0,061	0,452
0,550	0,776	0,620	1,214	0,910	1,237	0,095	0,973	0,721	0,076	0,557
0,632	1,013	0,877	1,110	0,882	0,809	0,099	0,863	0,620	0,063	0,589

Tabela A46- Medidas de resumo de absorvância obtidos a partir do teste de XTT, calculadas para os biofilmes das condições experimentais da MSSA, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de Resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 15-NE	PDT 15+NE	PDT 15 CIAIPc	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc
Média	0,60	0,59	0,40	0,76	0,78	0,63	0,17	0,73	0,34	0,08	0,43
Variância	0,026	0,005	0,057	0,009	0,032	0,022	0,002	0,018	0,013	0,001	0,005
Desvio padrão	0,16	0,07	0,24	0,09	0,18	0,15	0,04	0,13	0,12	0,04	0,07
Mediana	0,57	0,58	0,38	0,74	0,71	0,60	0,17	0,73	0,35	0,07	0,44
Mínimo	0,43	0,50	0,13	0,63	0,67	0,44	0,11	0,51	0,18	0,04	0,34
Máximo	0,88	0,72	0,77	0,94	1,25	0,86	0,26	1,00	0,50	0,14	0,54

Tabela A47- Medidas de resumo de absorvância obtidos a partir do teste de XTT, calculadas para os biofilmes das condições experimentais da MRSA, de acordo com a veiculação e dose de luz utilizadas. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Medidas de resumo	NC	C -NE	C +NE	C CIAIPc	LC	PDT 25-NE	PDT 25+NE	PDT 25 CIAIPc	PDT 50-NE	PDT 50+NE	PDT 50 CIAIPc
Média	0,53	0,76	0,57	1,11	0,92	0,77	0,13	0,89	0,83	0,16	0,52
Variância	0,011	0,024	0,040	0,023	0,013	0,062	0,001	0,014	0,015	0,053	0,011
Desvio padrão	0,11	0,16	0,20	0,15	0,12	0,25	0,02	0,12	0,12	0,23	0,11
Mediana	0,54	0,76	0,59	1,14	0,91	0,71	0,13	0,92	0,83	0,08	0,51
Mínimo	0,39	0,54	0,26	0,89	0,75	0,40	0,10	0,62	0,62	0,06	0,36
Máximo	0,71	1,01	0,88	1,29	1,19	1,24	0,17	1,01	0,98	0,81	0,69

Assim como observado para as demais análises estatísticas, os dados não apresentaram normalidade e homogeneidade, de forma que foi necessária a aplicação de teste não-paramétricos (Kruskal-Wallis e comparações múltiplas dos postos médios), Os resultados do teste de comparações múltiplas dos postos médios estão apresentados nas Tabelas A48 e A49.

Tabela A48- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de absorvância dos biofilmes de MSSA submetidos às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de absorvância (nm)	Comparações Múltiplas
NC	0,60	b
C -NE	0,59	b
C +NE	0,40	c
C CIAIPc	0,76	a
LC	0,78	a
PDT 15-NE	0,63	c
PDT 15+NE	0,17	d
PDT 15 CIAIPc	0,73	a
PDT 25-NE	0,34	b
PDT 25+NE	0,08	d
PDT 25 CIAIPc	0,43	c

Tabela A49- Resultado do teste de comparações múltiplas dos postos médios dos valores de absorvância dos biofilmes de MRSA submetidos às diferentes condições experimentais, ao nível de significância de 5%. Letras iguais não representam diferenças significativas entre grupos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2012

Grupos Experimentais	Média de absorvância (nm)	Comparações Múltiplas
NC	0,53	c
C -NE	0,76	d
C +NE	0,57	d
C CIAIPc	1,11	a
LC	0,92	b
PDT 25-NE	0,77	c
PDT 25+NE	0,13	e
PDT 25 CIAIPc	0,89	b
PDT 50-NE	0,83	b,c
PDT 50+NE	0,16	e
PDT 50 CIAIPc	0,52	d

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor).

Araraquara, 30 de Março de 2012.

ANA PAULA DIAS RIBEIRO