

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



*Livia Nordi Dovigo*

*Investigação do efeito fotodinâmico da  
curcumina sobre espécies de *Candida*.  
Estudos *in vitro* e *in vivo**

Araraquara

2011



*Livia Nordi Dovigo*



*Investigação do efeito fotodinâmico da  
curcumina sobre espécies de Candida.  
Estudos in vitro e in vivo*

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção de título de Doutor em Reabilitação Oral (Área de Concentração: Prótese).**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Pavarina**

*Araraquara*  
2011

Dovigo, Livia Nordi

Investigação do efeito fotodinâmico da curcumina sobre espécie de *Candida*. Estudo in vitro e in vivo / Livia Nordi Dovigo . – Araraquara: [s.n.], 2011.

197 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Curcumina    2. *Candida albicans*    3. *Candida tropicalis*  
4. *Candida glabrata*    5. Fotoquimioterapia    6. Candidíase bucal  
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

LÍVIA NORDI DOVIGO

Investigação do efeito fotodinâmico da  
curcumina sobre espécies de *Candida*.  
Estudos in vitro e in vivo

**COMISSÃO JULGADORA**

**Tese para obtenção do grau de doutor**

**Presidente e Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Pavarina

**2º Examinador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eunice Teresinha Giampaolo

**3º Examinador:** Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

**4º Examinador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

**5º Examinador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karin Hermana Neppelenbroek

**Araraquara, 28 de julho de 2011.**

# *Dados Curriculares*

*Livia Nordi Dovigo*

<b>NASCIMENTO</b>	27/07/1983 – São Carlos, São Paulo
<b>FILIAÇÃO</b>	Altair José Dovigo Mara Regina Petromilli Nordi Dovigo
<b>2001 a 2004</b>	Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2003 a 2004</b>	Estágio de Iniciação Científica nas Disciplinas de Dentística e Endodontia, do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2005 a 2007</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2005 a 2010</b>	Estágio docência nas Disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, e nas disciplinas de Orientação Profissional, e Bioestatística e Metodologia Científica, do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<b>2007 a 2011</b>	Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de concentração em Prótese, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

*“The most beautiful thing we can experience  
is the mysterious. It is the source of all  
true art and science.”*

*(Albert Einstein)*

# Dedicatória

*Dedico este trabalho...*

À *Deus*

Cuja misericórdia e graça permitiram que um sonho de criança se transformasse em uma verdadeira caminhada de vida.

Estando dentro de mim, é meu conforto e paz.  
Andando ao meu lado, me acompanha carinhosamente.  
Passando a minha frente, vai abrindo os caminhos.  
Estando acima de mim, derrama graças constantes.  
Caminhando atrás de mim, segue me protegendo.

A Ele toda a honra, glória e poder!

*Tudo o que fizerem, façam de todo o coração,  
como para o Senhor, e não para os homens,  
sabendo que receberão do Senhor  
a recompensa da herança.*

*(Cl 3.23-24)*

## *Dedico este trabalho...*

Aos meus pais *Altair e Mara*

Vocês iluminam minha vida. Com uma dedicação infinita e amor incondicional, renunciaram de seus sonhos em favor dos meus. Foram meus primeiros mestres, me ampararam nas quedas e, outras vezes, nem me deixaram cair. Quanto amor eu sinto por vocês...

Vocês emprestaram o nome de Deus – Pai – e me fizeram entender o significado e o poder desta palavra. Meus maiores exemplos de vida, hoje, vocês são para mim o mais próximo possível do céu.

Nada que eu tenha conquistado em minha vida seria possível sem vocês.

*"Why do birds suddenly appear, everytime you are near?  
Just like me, they long to be... Close to you*

*Why do stars fall off from the sky, everytime you walk by?  
Just like me, they long to be... Close to you*

*On the day that you were born the angels got together  
They decided to create a dream come true...  
So they sprinkled moondust in your hair,  
and golden starlight in your eyes of blue."  
(Close to you – The Carpenters)*



## *Dedico este trabalho...*

Ao meu marido *Fábio*

Você apareceu de uma forma quase inexplicável, e foi, aos poucos,  
preenchendo minha vida com amor e alegria.

Quando percebi, você era a razão de tudo o que eu pensava e fazia.  
Dedico este trabalho a você, a pessoa mais próxima a mim durante todos os  
dias deste doutorado. Sua bondade e generosidade permitiram que você  
compreendesse e apoiasse minhas decisões. Você insistiu quando eu já  
estava desistindo, você me mostrou o caminho quando eu já não queria  
mais enxergar, você estava sempre por perto para me abraçar!

Hoje você é meu amor, melhor amigo e companheiro.

Por isso, esta conquista também é sua.

Eu te amo!

*"And in this crazy life,  
and through these crazy times...*

*It's you, it's you  
You make me sing.*

*You're every line, you're every word,  
You're everything."  
(Everything – Michael Buble)*

# *Agradecimentos Especiais*

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. *Ana Cláudia Pavarina*.

Agradeço por todas as oportunidades concedidas, pela grande confiança em mim depositada e pela orientação em todas as fases da realização deste trabalho. Nossa convivência durante meus seis anos de pós-graduação só fez aumentar o respeito e admiração por você; seu apoio e exemplo foram muito importantes para minha formação como professora e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. *Iguatemy Lourenço Brunetti*, agradeço pela ajuda na busca por novos fotossensibilizadores, em especial a curcumina, e por sua participação no planejamento dos experimentos e nas discussões dos resultados, fundamentais para a execução deste estudo.

Aos professores do grupo de óptica Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. *Cristina Kurachi* e 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.

Aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível,  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> *Ana Lúcia Machado* , Prof. Dr. *Carlos Eduardo Vergani* e  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> *Eunice Teresinha Giampaolo* , meu agradecimento pela confiança  
depositada, pelos ensinamentos frequentes e pelo apoio com que me auxiliaram  
ao longo do curso de pós-graduação.

A querida Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> *Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia*, minha  
tia, amiga e inspiração para a vida. Muito obrigada pelos exemplos de  
determinação, fé e busca pela perfeição, que representam um guia em  
minha formação pessoal e profissional.

Aos amigos e fiéis companheiros do quinteto PaMaDaLiEw,  
*Paula, Mariana, Daniela e Ewerton* .

Agradeço por terem me acolhido e por fazerem parte de uma etapa tão  
importante na minha vida. Se existiu explicação para nosso encontro, com  
certeza foi a mão de Deus. Se existiram motivos para o surgimento de uma  
amizade tão forte e sincera entre nós, estes foram o caráter, a generosidade  
e amor de vocês, que me fizeram entender o sentido da nossa caminhada!

Vocês são inesquecíveis, inexplicáveis e incomparáveis!

À amiga e companheira *Tatiana* , que esteve presente durante toda a  
execução do estudo, auxiliando no preparo dos materiais de laboratório.  
Somente nós duas sabemos, verdadeiramente, o “tamanho” desse trabalho!

Muito obrigada pela disposição em ajudar!

A amiga *Juliana* , que prestou auxílio fundamental para a execução dos  
estudos, em especial nos experimentos com camundongos. Obrigada pela  
contribuição e pela oportunidade de crescermos juntas!

# *Agradecimentos*

Ao Prof. Dr. *Carlos Alberto de Souza Costa*, agradeço pela colaboração no desenvolvimento do projeto in vivo e pela importante participação na análise histopatológica das lâminas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. *Juliana Alvares Duarte Bonini Campos*, agradeço pela disponibilidade para transmitir seus conhecimentos na área de metodologia científica e bioestatística.

À querida “miga” *Paula*, que compartilhou comigo muitos momentos durante a execução deste trabalho. Agradeço pela amizade e pela ajuda em todos e “tantos” momentos. Você transformou muitos momentos difíceis em boas gargalhadas e contribuiu muito para minha formação e aprendizagem.

Ao querido amigo “*Mima*”, agradeço pela ajuda sincera em todos os momentos que precisei, em especial durante a seleção dos isolados clínicos e na metodologia do estudo in vivo.

A amiga “*Amandinha*”, pela disponibilidade em ajudar na etapa dos biofilmes.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, em especial a *Ana Paula*, pela disponibilidade em ensinar e ajudar durante os experimentos com culturas celulares.

As bolsistas de treinamento técnico *Tatiana, Sônia e Stela*, à amiga *Fernanda Vargas*, e à funcionária *Juliana Pirolla*, agradeço pelo carinho, atenção e eficiência nos trabalhos de laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, especialmente à aluna *Vânia* e ao funcionário *Marcos*, agradeço pela atenção e ajuda no preparo da curcumina.

Aos colegas do curso de doutorado, *Alejandro, Isabella, Juliê, Laiza, Luciano, Luís Eduardo, Paula e Pierre*, agradeço por todos os momentos de agradável convivência e companheirismo.

A todos os meus amigos de pós-graduação, em especial à *Amanda, Ana Paula, Camila, Carlos Eduardo, Carolina, Cristiane, Delise, Eduardo, Fernanda, Juliana, Karen, Mariana e Patrícia*, pelo ajuda e apoio em todos os momentos.

Aos colegas de pós-graduação das turmas anteriores, em especial *Daniela, Ewerton, Mariana, Janaína, Karin e Nara*. Agradeço pela atenção e apoio.

Aos alunos de iniciação científica *André, Camila, Carolina, Cynthia e Marina* muito obrigada pela oportunidade de crescermos juntos e pelo carinho e confiança que depositaram em mim.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa de seu diretor,  
Prof. Dr. *José Cláudio Martins Segalla*.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela valiosa participação em meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, em especial à *Adelaide, Lúcia, Marta, Malu e Sílvia*, pela acolhida e alegre convivência.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, pelos serviços prestados durante todo o curso.

Aos funcionários da biblioteca, especialmente à *Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas e Marley Cristina Chiusoli Montagnoli*, pelo auxílio na normatização da tese e ficha catalográfica.

Aos Membros da Banca Examinadora, por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Ao *Olympio Teixeira Neto*, por realizar com muita atenção e competência a análise dos dados deste estudo.

À senhora *Margery*, pela prontidão que sempre demonstrou ao revisar o inglês dos artigos científicos que constam na Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudos e pelo auxílio à pesquisa, concedidos para o desenvolvimento deste estudo.

À minha família, *Fábio, Altair, Mara, Carla, Milu e Juca*. Obrigada por aceitarem as minhas opções e compreenderem meus limites de não ter conseguido dar-lhes a atenção que merecem durante esse tempo que priorizei a concretização desse trabalho.

A todos os meus familiares, tios, primos, sogros, cunhada, sobrinho, e especial as minhas avós *Dinorah e Paulina* que com muito carinho sempre auxiliam em todos os momentos da minha vida.

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

*Let us be grateful to people who make us happy.*

*They are the charming gardeners  
who make our souls blossom.*

*(Marcel Proust)*

*"The best thing in life is to go ahead with all our plans and dreams, to embrace life and to live with passion, to lose and still keep the faith, and to win while been grateful.*

*All of this because the world belongs to those who dare and because life is really too short to be insignificant."*  
*(Charlie Chaplin)*



# *Sumário*

Resumo.....	16
Abstract.....	20
1 Introdução.....	24
2 Proposição.....	31
3 Capítulos.....	33
3.1 Capítulo 1.....	34
3.2 Capítulo 2.....	65
3.3 Capítulo 3.....	88
4 Discussão.....	109
5 Conclusão.....	126
6 Referências.....	129
7 Apêndice.....	142
8 Anexo.....	193

*Resumo*

---

---

Dovigo LN. Investigação do efeito fotodinâmico da curcumina sobre espécies de *Candida*. Estudos in vitro e in vivo [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## Resumo

Esta investigação teve como objetivo avaliar: 1. a viabilidade de utilização da curcumina como agente fotossensibilizador (PS) em Terapia Fotodinâmica (PDT) para inativação de uma cepa padrão de *Candida albicans* e seu efeito tóxico sobre culturas celulares de macrófagos; 2. a efetividade da PDT mediada pela curcumina para inativação de suspensões planctônicas e biofilmes formados por diferentes isolados clínicos de *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*; 3. a fotoinativação de *C. albicans*, presente em candidose induzida em camundongos, por meio da utilização de diferentes concentrações de curcumina. No primeiro estudo, suspensões planctônicas de *C. albicans* (ATCC 90028) foram expostas a nove concentrações de curcumina (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1, 5, 10 e 20 $\mu$ M) e oito doses de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20 e 26,4J/cm<sup>2</sup>). O efeito de diferentes tempos de pré-irradiação (PIT), a possível captação de curcumina pelas células fúngicas e participação do oxigênio singlete na fotoinativação também foram avaliados. Adicionalmente, a PDT mediada pela curcumina foi avaliada em biofilmes formados pela cepa de referência de *C. albicans* e sobre culturas celulares de macrófagos. Além disso, as características ópticas da solução de curcumina foram investigadas em função da dose de luz utilizada. Os resultados foram submetidos à análise descritiva, Análise de Variância (ANOVA) e Kruskal-Wallis ( $\alpha= 5\%$ ). As suspensões planctônicas de *C. albicans* foram completamente inativadas com a utilização de 20 $\mu$ M de curcumina e 5,28J/cm<sup>2</sup>. Além disso, foi observada redução significativa na viabilidade celular dos biofilmes de *C. albicans*. O efeito fotodinâmico foi acentuado pela presença da curcumina durante a iluminação e pela utilização de 20 minutos de PIT. Apesar da toxicidade observada nos macrófagos, a PDT foi mais efetiva para

## Resumo

inativar as células fúngicas do que as células imunológicas. Além disso, uma elevada taxa de fotodegradação da curcumina foi observada. No segundo estudo, suspensões planctônicas de 15 isolados clínicos de *Candida* foram expostas a três concentrações de curcumina (5, 10 e 20 $\mu$ M) e quatro doses de luz (5,28; 18; 25,5 e 37,5J/cm<sup>2</sup>). As concentrações de 20, 30 e 40 $\mu$ M foram selecionadas para avaliação da PDT sobre biofilmes, assim como as doses de 5,28 e 18J/cm<sup>2</sup>. A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada por meio do ensaio de XTT, e a biomassa foi avaliada por coloração Cristal Violeta (CV). Os resultados foram analisados segundo um modelo linear ANOVA aninhado, teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis ( $\alpha= 5\%$ ). As associações de curcumina e luz promoveram efeito antifúngico significativo nas suspensões planctônicas dos micro-organismos. Além disso, a utilização de 40 $\mu$ M de curcumina com 18J/cm<sup>2</sup> de luz promoveu reduções de 85, 85 e 73% na atividade metabólica dos biofilmes formados por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, respectivamente. Os resultados da coloração CV mostraram que a PDT reduziu a biomassa dos biofilmes, e que os isolados clínicos de *C. albicans* possuíram maior capacidade de formação de biofilme. No terceiro estudo, camundongos imunossuprimidos receberam uma inoculação tópica de *C. albicans* (10<sup>7</sup> UFC/mL) para indução de candidose experimental no dorso da língua. Após sete dias, a PDT foi aplicada sobre as lesões de *Candida* por meio da fotossensibilização com três concentrações de curcumina (20, 40 e 80 $\mu$ M), durante 20 minutos de PIT, e dose de luz de 37,5J/cm<sup>2</sup> (P+L+). A aplicação de curcumina sem luz (P+L-) e a utilização de luz sem curcumina (P-L+) também foram avaliadas. Animais com candidose induzida que não receberam tratamento foram considerados controle positivo (P-L-), e os animais que não receberam imunossupressão, inoculação, nem tratamento foram considerados controle negativo (NCG). As línguas de todos os animais foram removidas para avaliação histológica. A viabilidade de *C. albicans* foi determinada por meio de contagem de colônias (UFC/mL) e os resultados foram analisados com ANOVA e teste de Tukey ( $\alpha= 5\%$ ). Foi observado que todas as associações de curcumina e luz promoveram redução significativa na viabilidade de *C. albicans*, em comparação com o grupo P-L-. Nestes casos, a utilização de

## Resumo

80 $\mu$ M promoveu a maior redução no número de colônias, sendo superior que 4 logs. Os valores de UFC/mL encontrados nos grupos P-L-, P+L- e P-L+ foram semelhantes. Além disso, a análise histológica sugeriu que a PDT não ocasionou nenhum efeito tóxico aos tecidos subjacentes. Após a realização dos três estudos foi possível concluir que a PDT mediada pela curcumina parece ser um método efetivo para inativação de diferentes espécies de *Candida*. Os resultados do estudo in vivo podem sugerir sua futura aplicação para o tratamento clínico de pacientes com candidose bucal.

**Palavras-chave:** Curcumina, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, Fotoquimioterapia, Candidíase Bucal

# *Abstract*

---

---

Dovigo LN. Investigation of the photodynamic effect of curcumin against *Candida*. In vitro and in vivo studies. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## *Abstract*

The aim of this investigation was to evaluate: 1. the Photodynamic Therapy (PDT) mediated by curcumin for in vitro inactivation of a reference strain of *Candida albicans* and its cytotoxic effects against a macrophage cell line; 2. the effectiveness of PDT mediated by curcumin to inactivate clinical isolates of *C. albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*, both in planktonic and biofilm phases; 3. the photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidiasis using different curcumin concentrations. In the first study, suspensions of *C. albicans* were treated with nine curcumin concentrations (0.005; 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1, 5, 10 and 20 $\mu$ M) and exposed to LED light at different fluences (1.32; 2.64; 3.96; 5.28; 6.60; 13.20 and 26.4J/cm<sup>2</sup>). The effect of the pre-irradiation time (PIT) on PDT effectiveness, the uptake of curcumin by *C. albicans* cells and the possible involvement of singlet oxygen in the photodynamic action was also evaluated. In addition, curcumin-mediated PDT was assessed against biofilms. Similar protocols were tested on a macrophage cell line and the effect was evaluated by MTT and SEM analysis. The optical properties of curcumin were investigated as a function of illumination fluence. Data were analyzed with Analysis of Variance (ANOVA), and Kruskal-Wallis test ( $\alpha= 5\%$ ). The results showed a statistically significant reduction in *C. albicans* viability after PDT ( $p<0.05$ ), for both planktonic and biofilm cultures. Photodynamic effect was greatly increased with the presence of curcumin in the surrounding media and the PIT of 20 minutes improved PDT effectiveness. Although PDT was phototoxic to macrophages, the therapy was more effective in inactivating the yeast cell than the defense cell. The spectral changes showed a high photobleaching rate of curcumin. In the second study, planktonic suspensions of each *Candida* isolate were treated with three curcumin concentrations (5, 10 and 20 $\mu$ M) and exposed to

## Abstract

four LED fluences (5.28; 18; 25.5 and 37.5J/cm<sup>2</sup>). The protocol that showed the best outcome for inactivation of the planktonic phase was selected to be evaluated against *Candida* biofilms (20μM; 5.28 and 18J/cm<sup>2</sup>). In addition, two higher curcumin concentrations were tested (30 and 40μM). The metabolic activity of biofilms was evaluated by means of XTT reduction assay and the biofilm biomass was evaluated using Crystal Violet (CV) staining assay. Data were analyzed in a mixed model nested ANOVA, Wilcoxon's nonparametric tests and the Kruskal-Wallis test ( $\alpha= 5\%$ ). The use of curcumin in association with light was able to promote a significant antifungal effect against the planktonic form of the yeasts. Using 40μM and 18J/cm<sup>2</sup>, the metabolic activity of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* biofilms was reduced by 85, 85 and 73% respectively. Curcumin-mediated PDT also decreased the biofilm biomass of all species evaluated. In addition, CV staining showed that *C. albicans* isolates were strong biofilm-forming strains, when compared with *C. glabrata* and *C. tropicalis* isolates. In the third study, mice were immunosuppressed, provided tetracycline to their drinking water, and then orally swabbed with a suspension of *C. albicans* (10<sup>7</sup> CFU/mL). Five days after oral inoculation, PDT was performed on the dorsum of the tongue after topical administration of curcumin at 20, 40 and 80μM (20 min of PIT) and illumination with LED light (37.5J/cm<sup>2</sup>). The use of curcumin or light alone were also evaluated (P+L- and P-L+, respectively). Positive control animals did not receive any treatment (P-L-) and negative control animals were not inoculated with *C. albicans* (NCG). Tongues were surgically removed and processed for histological evaluation. The number of surviving yeast cells was determined (CFU/mL) and analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests ( $\alpha=0.05$ ). All associations of curcumin with LED light were able to significantly reduce *C. albicans* viability after PDT, when compared with P-L- group. The use of 80μM associated with light was able to promoted the highest log<sub>10</sub> reduction in colony counts (over than 4 logs), whitout harming the host tissues. The colony counts from P-L-, P+L- and P-L+ groups remained constant. In conclusion, curcumin-mediated PDT proved to be effective for in vitro and in vivo inactivation of *Candida* spp. The in vivo findings support the continued investigation of



## *Abstract*

curcumin-mediated PDT as an antifungal therapy for oral candidiasis, and merit consideration for application in future clinical trials.

**Keywords:** Curcumin; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, Photochemotherapy, Candidiasis Oral

# *1 Introdução*

---

---

# 1 Introdução

As espécies do gênero *Candida* são frequentemente isoladas da cavidade bucal na maioria dos indivíduos saudáveis<sup>3</sup>, vivendo normalmente em relação de comensalismo. No entanto, sob determinadas condições, esses microorganismos podem atuar como patógenos oportunistas, invadindo tecidos e desencadeando processos infecciosos, tais como lesões superficiais localizadas e complicações sistêmicas<sup>37,41,79,99</sup>. A *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente nos indivíduos saudáveis e também nos portadores de candidose<sup>3</sup>. No entanto, o número de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, tais como a *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, tem aumentado significativamente nos últimos anos<sup>25,58,113</sup>.

A candidose bucal e a orofaríngea são consideradas as infecções fúngicas mais frequentes entre humanos, que se desenvolvem após aumento da colonização por *Candida* spp. e subsequente infecção dos tecidos moles da cavidade bucal e orofaríngea<sup>3</sup>. Algumas alterações sistêmicas nos indivíduos podem predispor ao desenvolvimento da candidose, principalmente aquelas que comprometem o sistema imunológico e, portanto, diminuem os mecanismos de defesa<sup>76</sup>. Por isso, esta infecção apresenta alta prevalência em pacientes diabéticos, nos que fazem uso de medicamentos imunossupressores, antibióticos de amplo espectro e terapias antineoplásicas e nos que possuem imunossupressão relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)<sup>37,60,99,103</sup>. A candidose orofaríngea é frequente em pacientes com comprometimento sistêmico, especialmente nos portadores da AIDS, e pode se apresentar nas formas pseudomembranosa e eritematosa, acometendo mucosas bucais, orofaríngea e língua. Quando há envolvimento do esôfago, os pacientes podem apresentar dificuldade de deglutição dos alimentos o que leva ao surgimento de deficiências nutricionais, perda de peso e comprometimento da saúde geral e bem estar do paciente<sup>30</sup>. Além disso, a constante aspiração e deglutição das espécies fúngicas em pacientes com saúde geral comprometida pode estar associada ao desenvolvimento de formas disseminadas da doença. Algumas investigações têm

## 1 Introdução

documentado taxas crescentes de infecções sistêmicas ocasionadas por *C. glabrata* e *C. tropicalis*<sup>25,58,113</sup>. Nesses casos, a presença de cepas de *C. tropicalis* parece elevar do risco dos pacientes ao desenvolvimento de fungemia<sup>25</sup>. Entre indivíduos imunocomprometidos, o número de mortes como resultado da infecção sistêmica por *Candida* spp. pode variar entre 40% a 80%<sup>1,20,23,31,42</sup>.

Além das alterações sistêmicas, alguns fatores locais como redução do fluxo salivar, trauma local, alterações de pH e uso de próteses dentais também podem estar associados ao desenvolvimento das infecções bucais por espécies de *Candida*<sup>13,76,62</sup>. A colonização microbiana e subsequente formação de biofilme nas superfícies protéticas das próteses dentais removíveis é um importante fator relacionado ao desenvolvimento de uma forma de candidose conhecida como estomatite protética<sup>41</sup>. Essa infecção caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos na mucosa subjacente às próteses dos pacientes, e, em casos mais avançados, também podem ser observadas áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar do palato<sup>110</sup>.

Os tratamentos atualmente disponíveis para candidose bucal e orofaríngea são baseados na administração de medicamentos antifúngicos tópicos e sistêmicos. Os medicamentos de uso tópico, como a nistatina, miconazol e clorexidina, são normalmente aplicados nos primeiros episódios de candidose de um paciente<sup>6,8,11,59,73</sup>. A remissão dos sinais e sintomas clínicos da infecção é normalmente observada, mas esses resultados são temporários na maioria dos casos. Isso ocorre em virtude da diminuição da concentração do agente tópico nos tecidos infectados, muitas vezes associada aos efeitos diluentes da saliva e aos movimentos da língua, o que não permite a completa eliminação dos microorganismos<sup>6,8,11,57,59,73</sup>. Como consequência, a re-colonização fúngica ocorre após o término do tratamento, o que leva a recidiva da infecção<sup>70</sup>. Além disso, a necessidade de posologia de doses múltiplas e o sabor desagradável do medicamento pode dificultar a cooperação do paciente com o tratamento<sup>11</sup>. A medicação sistêmica é usualmente instituída em indivíduos com saúde geral comprometida e nos episódios de infecções recorrentes<sup>76</sup>. Nesses casos, medicamentos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B podem ser

## 1 Introdução

utilizados<sup>11,59,76</sup>. Esses agentes vêm sendo amplamente empregados para o tratamento da candidose, especialmente em pacientes imunocomprometidos. No entanto, sua utilização deve ser cautelosa em razão da possibilidade de efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos<sup>87</sup>.

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. Resistência antifúngica pode ser definida como a persistência ou a progressão de uma infecção após aplicação do tratamento antimicrobiano<sup>108</sup>. A resistência intrínseca ou primária ocorre quando um micro-organismo apresenta baixa susceptibilidade a uma determinada medicação, previamente a sua exposição ao agente. Algumas espécies de *Candida* possuem resistência intrínseca aos medicamentos antifúngicos, especialmente ao fluconazol<sup>78,85,101</sup>. Estudos sugerem a ocorrência de substituição de cepas mais sensíveis por outras intrinsecamente resistentes aos medicamentos, entre elas a *C. glabrata*, em lesões tratadas com medicamentos antifúngicos<sup>4,49,67</sup>. Já, a resistência secundária é aquela que pode ser desenvolvida pelo micro-organismo após longos períodos de exposição a drogas antifúngicas<sup>108</sup>. Neste contexto, parece provável que as espécies de *Candida* desenvolvam mecanismos de resistência que ocasionam reduzida sensibilidade aos agentes antifúngicos, especialmente aos do tipo “azólicos”<sup>4,43,49</sup>. Também vem sendo sugerido que diferentes cepas pertencentes à mesma espécie possam apresentar características individuais, como a resistência antifúngica, capacidade de adesão a diferentes substratos e capacidade de formação de biofilme<sup>56,63,77,64,82,83</sup>. Além disso, a resistência antifúngica é uma característica muito importante nos biofilmes de *Candida*, e está associada à presença da matriz extracelular, a existência de processos metabólicos complexos e interações entre os micro-organismos<sup>82,83,88</sup>.

Devido à elevada ocorrência das infecções fúngicas e as deficiências apresentadas pelos tratamentos atualmente disponíveis, muitas pesquisas vêm direcionando seus objetivos para o desenvolvimento de estratégias alternativas no tratamento de infecções localizadas como a candidose bucal<sup>109</sup>. Uma modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos

## 1 Introdução

patogênicos é a Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)<sup>94</sup>, também denominada de Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês, *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*)<sup>106</sup> ou Inativação Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Inactivation*)<sup>44</sup>. Historicamente, a associação de substâncias químicas e luz foi relatada no final do século XIX por Oscar Raab, o qual investigou o efeito antimicrobiano dos corantes eosina e acridina, na presença de luz, sobre *Paramecium caudatum*<sup>53</sup>. No entanto, a literatura científica mostra que a PDT foi intensamente investigada como alternativa para tratamento de lesões de câncer<sup>48</sup>. A extensão da PDT como modalidade terapêutica para o tratamento de doenças não-oncológicas, incluindo a inativação microbiana e tratamento de infecções, ainda representa um recente campo de investigações científicas<sup>71,94</sup>.

O processo fotodinâmico requer a utilização de um agente fotossensibilizador (PS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do PS, e a presença de oxigênio<sup>21,48,53,94,106</sup>. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o PS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. O período de tempo no qual as células microbianas ficam em contato com o PS, sem a presença de luz, é conhecido como tempo de pré-irradiação (PIT) e parece ser dependente do tipo de PS utilizado<sup>51,111</sup>. Após este período, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o PS, na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas capazes de induzir a inativação celular<sup>21,48,53,65,94,106</sup>. Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo PS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o PS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, para retornar ao seu estado natural, por meio de dois principais mecanismos. Um deles é transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I). O outro mecanismo ocorre por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )<sup>21,94</sup>. Ambos os caminhos podem levar à morte celular. No entanto, os hidroperóxidos resultantes da reação do tipo

## 1 Introdução

I podem levar à formação de diferentes espécies reativas, as quais possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas. Isso significa que qualquer macromolécula celular pode ser um alvo em potencial para PDT<sup>21,94</sup>. Por essa razão, a PDT parece possuir uma importante vantagem em comparação aos tratamentos antifúngicos convencionais, já que a multiplicidade de alvos torna improvável o desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos expostos<sup>32</sup>.

Os compostos derivados da hematoporfina estão entre os primeiros PSs estudados para aplicação em PDT<sup>32</sup>. O tratamento fotodinâmico de tumores é frequentemente baseado nas porfirinas e seus análogos, pois estes PSs podem ser administrados sistemicamente ocasionando a rápida retenção do composto nos tecidos com altas taxas de proliferação celular<sup>48</sup>. Como a aplicação antimicrobiana da PDT é direcionada ao tratamento de infecções superficiais, diversos outros tipos de PSs tem sido propostos, como as fenotiazinas<sup>74,114</sup>, ftalocianinas<sup>66</sup> e clorinas<sup>22,95</sup>. Entretanto, a completa inativação dos micro-organismos não é frequentemente observada e alguns PSs disponíveis já mostraram reduzido efeito antimicrobiano em biofilmes de *Candida* e modelos animais de candidose<sup>34,71</sup>. De acordo com o mecanismo de ação da PDT sobre as células microbianas, a interação entre as moléculas do PS com membranas celulares e estruturas intracelulares possui grande importância para a ação da PDT<sup>32,53,94,106</sup>. Tendo em vista a grande diversidade de micro-organismos existentes nas infecções, é razoável supor que sejam necessários compostos químicos com características físico-químicas adequadas a fotoinativação microbiana. Neste contexto, a investigação de novos PSs com elevada efetividade na inativação de micro-organismos ainda é um importante desafio.

A curcumina é um pigmento natural, de coloração amarela, extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., conhecida também como açafrão-da-índia<sup>36</sup>. Esta planta é originária do sudeste da Ásia, e vem sendo tradicionalmente utilizada como condimento alimentar e também como medicamento natural na medicina tradicional indiana<sup>36</sup>. Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem confirmado o potencial terapêutico da curcumina, como seu efeito anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano,

## 1 Introdução

antifúngico e antitumoral<sup>2,5,36,81,91,92,105</sup>. Estudos também têm sugerido que alguns desses efeitos poderiam ser acentuados com a exposição da curcumina a uma fonte de luz<sup>12,26,35,80,100</sup>. A ação fotodinâmica dos derivados de curcumina tem sido investigada mais frequentemente com a finalidade de tratamento de tumores, bem como sua farmacocinética, toxicidade e eficácia da substância<sup>35,80</sup>. Adicionalmente, alguns estudos mostraram que a fotoinativação microbiana pode ser obtida<sup>46,47</sup>. Recentemente, Haukvik et al.<sup>46</sup> descreveram o efeito tóxico de duas concentrações de curcumina (2,5 e 25,0 $\mu$ M) associadas a luz azul (5J/cm<sup>2</sup>) sobre células de *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. A alta capacidade de absorção de luz em comprimentos de onda próximos ao azul faz com que a curcumina seja um potencial PS para o tratamento de lesões superficiais, uma vez que estas não requerem profunda penetração da luz nos tecidos para seu tratamento. Investigações recentes também sugeriram que a curcumina pode apresentar efeito antifúngico sobre espécies de *Candida*<sup>40,68,102</sup>, porém tais estudos foram conduzidos sem a associação do composto com luz. No entanto, os resultados do estudo de Neelofar et al.<sup>72</sup> mostraram que a utilização da curcumina sem luz promoveu inibição do crescimento de *Candida* spp. mediante a utilização de altas concentrações da droga, em comparação as concentrações efetivas do fluconazol.

Em face dos resultados promissores obtidos com a fotoinativação de bactérias patogênicas após utilização da curcumina e, tendo em vista o potencial antifúngico apresentado por este composto, o presente estudo avaliou a associação da curcumina com luz para inativação de *Candida* spp. O efeito fotodinâmico da curcumina foi avaliado por meio da utilização de luz proveniente de diodos emissores de luz (LED). Foram realizados dois estudos in vitro (Capítulos 1 e 2) para possibilitar a definição de parâmetros efetivos para inativação fúngica, bem como a compreensão do mecanismo de inativação celular. Além disso, também foi realizado um estudo in vivo (Capítulo 3) utilizando um modelo animal de candidose bucal, para possibilitar a investigação da efetividade da PDT em situações mais próximas àquelas encontradas clinicamente.



## *2 Proposição*

---

---

## 2 Proposição

De acordo com as informações apresentadas na seção anterior, esta investigação teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização da curcumina como PS para fotoinativação de espécies de *Candida*. 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 uma cepa padrão de *C. albicans*. Também foram avaliadas a fotodegradação da curcumina, a produção de oxigênio singlete e a citotoxicidade da terapia em cultura celular de macrófagos.

2. Avaliar in vitro o efeito antifúngico de diferentes protocolos de PDT mediada pela curcumina na inativação de isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, na forma de suspensões planctônicas e biofilme.

3. Avaliar in vivo a fotoinativação de *C. albicans*, presente em lesões de candidose bucal induzidas em línguas de camundongos, por meio da utilização de diferentes concentrações de curcumina.

# *3 Capítulos*

---

---

## 3.1 *Capítulo 1*

### **Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*\***

Lívia Nordi Dovigo <sup>1</sup>

Ana Cláudia Pavarina <sup>1†</sup>

Ana Paula Dias Ribeiro <sup>1</sup>

Iguatemy Lourenço Brunetti <sup>2</sup>

Carlos Alberto de Souza Costa <sup>1</sup>

Denis Pablo Jacomassi <sup>3</sup>

Vanderlei Salvador Bagnato <sup>3</sup>

Cristina Kurachi <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>2</sup> Department of Clinical Analyses, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>3</sup> Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo – USP, São Carlos, SP, Brazil

† Corresponding author email: [pavarina@foar.unesp.br](mailto:pavarina@foar.unesp.br) (Ana Cláudia Pavarina)

---

\* Artigo publicado no periódico **Photochemistry and Photobiology** (Anexo 8.1)

### 3.1 Capitulo 1

#### **ABSTRACT**

This study describes the association of curcumin with LED light for the inactivation of *Candida albicans*. Suspensions of *Candida* were treated with nine curcumin concentrations and exposed to LED at different fluences. The protocol that showed the best outcomes for *Candida* inactivation was selected to evaluate the effect of the pre-irradiation time (PIT) on PDT effectiveness, the uptake of curcumin by *C. albicans* cells and the possible involvement of singlet oxygen in the photodynamic action. Curcumin-mediated PDT was also assessed against biofilms. In addition to the microbiological experiments, similar protocols were tested on a macrophage cell line and the effect was evaluated by MTT and SEM analysis. The optical properties of curcumin were investigated as a function of illumination fluence. When compared with the control group, a statistically significant reduction in *C. albicans* viability was observed after PDT ( $p < 0.05$ ), for both planktonic and biofilm cultures. Photodynamic effect was greatly increased with the presence of curcumin in the surrounding media and the PIT of 20 minutes improved PDT effectiveness against biofilms. Although PDT was phototoxic to macrophages, the therapy was more effective in inactivating the yeast cell than the defense cell. The spectral changes showed a high photobleaching rate of curcumin.

#### **INTRODUCTION**

*Candida albicans* and other *Candida* species are important pathogens associated with opportunistic fungal diseases (1), especially in immunocompromised patients (2) and denture wearers (3). These microorganisms can cause superficial mucosal infection such as oral candidosis and denture stomatitis, and also disseminate other forms of diseases (4). According to the National Nosocomial Infections Surveillance System (United States), *Candida* spp. are the most common cause of fungal infection in critically ill patients (5). In addition, some investigations have shown that fungi are involved in up to 17% of all nosocomial infections (6,7), and 9–12% of nosocomial blood stream infections (5,8,9). The treatments available for *Candida* infection are typically drug based

### 3.1 Capitulo 1

and can involve topical and systemic antifungal agents (2). However, antifungal treatment is limited to a very small number of drug substances and the widespread use of these agents, especially the azoles, has resulted in global emergence of antifungal resistance and subsequent treatment failures (10,11). Moreover, due to the fungistatic rather than fungicidal effect of azoles (12), host defenses are essential for eradicating of the infection. Therefore, the use of azole agents for oral candidosis in immunosuppressed patients can be ineffective.

The increasing incidence of fungal infections, coupled with the growing resistance against antifungal agents, has driven research to the development of alternative strategies, such as topical photodynamic therapy (PDT). Conventional applications of PDT include the use of a sensitizing compound and visible light to kill fast growing and tumor cells (13). The extension of PDT as a therapeutic modality for the treatment of some non-oncological diseases, including microbial inactivation and treatment of infections, represents a new important field (14). Photodynamic inactivation of microorganisms is based on the combination of a drug, known as photosensitizer (PS), and the delivery of a visible light of the appropriate wavelength to excite the PS molecule (15). The interactions of the PS in the excited state with oxygen produce cytotoxic species that lead to microbial destruction (15). When compared with other therapies, PDT has several advantages, such as high target specificity (PS can be delivered to cells and light can be focused on the site of the lesion), few undesired side effects, and little likelihood of leading to the development of resistance by microorganisms (16).

Hematoporphyrin derivatives are among the earliest type of PS used (16). The sensitizers commonly used in anti-cancer PDT are based on porphyrins and their analogs, which can be administered systemically for retention in rapidly proliferating cells (13). In addition, different types of PS have been proposed for antimicrobial PDT. PS interaction with the cellular membranes and intracellular structures is of great relevance in the response to PDT. Due to the vast diversity of microorganisms, a PS with distinct physicochemical properties may be required. Curcumin is a naturally occurring, intensely yellow pigment that is isolated from rhizomes of the *Curcuma longa* plant (17). It is a constituent of the spice turmeric,

### 3.1 Capitulo 1

and is in worldwide use as a cooking spice, flavoring agent and colorant. An increasing number of investigations have suggested that curcumin exhibits potential therapeutic applications such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antifungal (18) and anticancer properties (17). Some studies have also proposed that these effects may possibly be enhanced by combination with light (19, 20), thus attracting researchers to explore its use in several areas including photochemistry and photobiology. Investigations in this field are mainly focused on the anti-cancer properties of the dye and its association with light. A number of trials dealing with cancer have focused on the pharmacokinetics, safety, and efficacy of curcumin use in humans. In addition, the photokilling of some microorganisms by curcumin has been investigated. Recently, Haukvik et al. (21) suggested the phototoxic potential of a series of curcumin derivatives against *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. The microorganisms were treated with two curcuminoid preparations (2.5 and 25.0 $\mu$ M) in combination with blue light (5J/cm<sup>2</sup>). In view of the promising results, some authors have proposed the use of different formulations of curcumin, such as curcumin loaded alginate foams, in order to provide a burst release of the PS in infected wounds (22)

As *Candida* species already have shown susceptibility to some curcumin preparations (18,23), the present investigation was focused on evaluating whether the antifungal effects could be improved with light excitation. Therefore, the aim of this study was to investigate the photodynamic effect of curcumin against *C. albicans*. In addition, the same protocol was evaluated against a macrophage cell line in order to establish the cytotoxicity levels of the therapy.

#### **MATERIALS AND METHODS**

**Photosensitizer and light source for PDT:** Natural curcumin (Fluka Co.) was obtained from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. A stock solution of curcumin (200 $\mu$ M) was prepared in DMSO and then diluted in saline solution to obtain the concentrations to be tested (keeping the final concentration of DMSO at 10%). The 10% concentration of DMSO was selected since has been shown to have no

### 3.1 *Capítulo 1*

effects on *Candida* viability (data not shown). A light emitting diode (LED) based device, composed of eight royal blue LEDs (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA), was used to excite the curcumin (22). The LED device provided a uniform emission from 440nm to 460nm, with maximum emission at 455nm. The irradiance delivered was of 22mW/cm<sup>2</sup>.

**Planktonic culture of *C. albicans* and PDT treatments:** 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-Peptone-Glucose medium and frozen at -70°C. To obtain the standardized suspensions of *Candida*, the yeast was individually inoculated in Tryptic Soy Broth, incubated, harvested after centrifugation, washed and resuspended in sterile saline as previously described (24).

The first experiments were conducted to evaluate a range of nine different curcumin concentrations in association with LED illumination at fluence of 37.5J/cm<sup>2</sup> (approximately 29 min of illumination). The concentrations used were 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 20µM, which correspond to 0.0018, 0.0037, 0.018, 0.037, 0.18, 0.37, 1.8, 3.7 and 7.4mg/L. Aliquots of 100µl of the standardized suspensions of *Candida* were individually transferred to separate wells of a 96-well microtitre plate. Curcumin solutions were added to the wells to give the above-mentioned final concentrations. After dark incubation for 20 min (pre-irradiation time), the plate was placed on the LED device and illumination performed (P+L+). To determine whether curcumin alone, at the tested concentrations, induced any effect on cell viability (dark toxicity), additional wells containing the yeast suspensions were exposed to PS under identical conditions to those described above, but not to LED light (P+L-). The overall control consisted of *Candida* suspensions not exposed to PS or LED light, but treated with 10% DMSO (P-L-). To determine cell survival, ten-fold serial dilutions of aliquots of the contents of each well were prepared using sterile saline. Duplicate 25µl aliquots were plated on Sabouraud Dextrose agar medium containing 5mg/L gentamicin (SDA). All plates were aerobically incubated at



### 3.1 Capítulo 1

37°C for 48 hours and after this, 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.

Based on the results of the experiments reported above, the three concentrations of curcumin (5, 10 and 20 $\mu$ M) that achieved the most promising results for *C. albicans* inactivation were selected for association with lower light fluences (1.32, 2.64, 3.96, 5.28, 6.60, 13.20 and 26.4J/cm<sup>2</sup>). The experimental protocol was carried out as outlined above except that suspensions were illuminated for different periods of time to achieve the fluences proposed (1, 2, 3, 4, 5, 10 and 20 minutes respectively). Colony counts and the CFU/mL values were obtained as previously described.

The influence of pre-irradiation time (PIT), *i.e.* incubation of yeast cells with curcumin preceding illumination, on the effectiveness of PDT was investigated using 20 $\mu$ M of curcumin and 5.28J/cm<sup>2</sup>. In addition, the possible uptake of curcumin by *C. albicans* cells was also estimated by removing curcumin before illumination. The protocol was conducted as outlined above, except that curcumin solution was added to the *Candida* suspensions and incubated in the dark for 5 or 20 minutes before illumination. In order to determine the penetration/uptake of curcumin by cells, additional samples were washed after the PIT and the cells were resuspended in fresh saline. Thus, the unbound curcumin was removed from the samples and only the curcumin associated with the cells remained during LED exposure. Survival of *C. albicans* was assessed by means of colony counts (CFU/mL) as previously described.

Finally, planktonic suspensions were also used to investigate the possible involvement of singlet oxygen in photodynamic inactivation of the yeast. For this purpose, the protocol of 20 $\mu$ M-curcumin and 5.28J/cm<sup>2</sup> was repeated as already described, but a sodium azide (NaN<sub>3</sub>) solution at 100, 50 and 1mM was added to the samples prior illumination. NaN<sub>3</sub> is a known suppressor of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (25,26). The effectiveness of PDT in killing the *Candida* suspensions was assessed by means of colony counts, in samples with and without NaN<sub>3</sub> solution.

### 3.1 *Capítulo 1*

***C. albicans* biofilm and PDT treatments:** For the biofilm experiment, the yeast were individually inoculated in 5mL of RPMI 1640 and incubated overnight in an orbital shaker (AP 56, Phoenix Ind Com Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil) at 37°C for 16h. After incubation, the yeast were washed twice with 5mL of PBS (phosphate-buffered saline), and suspended to  $10^7$  cells/mL by adjusting the optical density of the suspension to 0.38 at 520nm (27,28). *Candida* biofilm formation was allowed to occur in pre-sterilized polystyrene, flat-bottomed 96-well microtiter plates. Aliquots of 100 $\mu$ L of the standard cell suspension were transferred into each well, and the plate was incubated at 37°C for 1.5h in an orbital shaker at 75rpm (adhesion phase). After the adhesion phase, the suspensions were carefully aspirated, and each well was washed twice with 150 $\mu$ L of PBS to remove non-adherent cells. In order to allow biofilm growth, 150 $\mu$ L of fresh RPMI 1640 was transferred into each well, and the plates were incubated at 37°C for 48h at 75 rpm.

After the formation of biofilms, the wells were carefully washed twice with 200 $\mu$ L of PBS to remove remaining non-adherent cells. After that, 100 $\mu$ L of curcumin solution was added to each well. The curcumin concentrations tested were 5, 10, 20, 30 and 40 $\mu$ M, which corresponded to 1.8, 3.7, 7.4, 11.05 and 14.7mg/L. The plates were incubated in the dark for 5 or 20 min, followed by illumination of 5.28J/cm<sup>2</sup>. Control wells received PBS instead of curcumin solution and samples were not illuminated (P-L-).

The antifungal effects against the biofilms were evaluated by a metabolic assay based on the reduction of XTT, a tetrazolium salt (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). To prepare the XTT solution, the salt was dissolved in PBS (1mg/mL) and stored at -70°C. For each experiment, 158 $\mu$ L of PBS prepared with glucose at 200mM, 40 $\mu$ L of XTT plus 2 $\mu$ L of menadione at 0.4mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were mixed and transferred to each well. The plates were incubated in the dark at 37°C for 3h. After this 100 $\mu$ L of the reacted XTT salt solution was transferred to a new 96-well microtiter 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.

### 3.1 *Capitulo 1*

**Macrophage culture, PDT treatments, analysis of cell metabolism by MTT and morphology by SEM:** An immortalized macrophage cell line (RAW 264.7) was cultured in DMEM (Sigma Chemical Co.) supplemented with 10% bovine fetal serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), plus 100 IU/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2mmol/L glutamine (Gibco, Grand Island) in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> 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/cm<sup>2</sup>) and incubated for 72 hours.

After incubation, the culture medium was removed and cells were washed with PBS. Aliquots of 350µL of curcumin at final concentrations of 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 20µM were transferred individually to wells in 24-well plates and were incubated in contact with the cells in the dark for 20 minutes. After the incubation period, cells were irradiated for 4 minutes, corresponding to 5.28J/cm<sup>2</sup> (P+L+). Additional wells containing cells exposed only to curcumin at the three highest concentrations (P+L-), or only to LED light (P-L+) were also evaluated. The negative control group was composed of cells not exposed to LED light or curcumin (P-L-). Cell metabolism was evaluated by succinic dehydrogenase (SDH) enzyme, which is a measure of the mitochondrial respiration of the cell (29). In 10 wells, 900µL of Eagle's medium associated with 100µL of MTT solution (5mg/mL sterile PBS) (Sigma Chemical Co.) was added to the cells cultured in each well and incubated at 37°C for 4h. After this, the culture medium (Eagle's medium with the MTT solution) was aspirated and replaced by 600µL of acidified isopropanol solution (0.04N HCl) to dissolve the blue formazan crystals present in the cells. Cell metabolism was determined as being proportional to the absorbance measured at 570nm wavelength with the use of an ELISA plate reader (BIO-RAD, model 3550-UV, microplate reader, Hercules, CA, USA).

For RAW 264.7 macrophage morphology analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM), sterile cover glasses 12mm in diameter (Fisher Scientific)

### 3.1 *Capitulo 1*

were placed on the bottom of the wells of all experimental and control groups immediately before cell seeding. Immediately after the experimental conditions, the culture medium was removed and the viable cells that remained adhered to the glass substrate were fixed in 1mL 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%), 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 metal stubs, sputter-coated with gold and the morphology of the surface-adhered macrophages was examined by SEM (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, Tokyo, Japan).

**Analysis of curcumin absorption and fluorescence spectra:** The optical properties of curcumin were systematically investigated before and as a function of illumination fluence. Curcumin solution (20 $\mu$ M) was illuminated using the blue-LED device for a total of 29 minutes. Absorption and fluorescence spectra were measured at illumination times intervals of 1, 2, 3, 4, 5 10, 20 and 29 minutes, which corresponded to 1.32, 2.64, 3.96, 5.28, 6.60, 13.20, 26.4 and 37.5J/cm<sup>2</sup>. Absorption spectra were obtained using a UV-visible spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian). Laser-induced fluorescence was taken using a homemade device under 405nm excitation and a USB4000 spectrometer (Ocean Optics) to collect the emitted light at the interval from 350-800nm. The absorption and fluorescence spectra were analyzed to determine the photobleaching rate and the possible presence of photoproducts in the illuminated curcumin solution (26,30).

**Statistical analysis:** Each experimental treatment with the curcumin concentrations in the presence of the mentioned light fluences was repeated five times. For the purpose of analysis, CFU/mL values were transformed into logarithm (log<sub>10</sub>). The results collected after the evaluation of nine curcumin

### 3.1 *Capítulo 1*

concentrations against planktonic suspensions ( $\log(\text{CFU/mL})$ ), the biofilm cultures (microbial metabolism-XTT) and the macrophages (cell metabolism-MTT) presented normality and homoscedasticity, and were evaluated by the Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey Honestly Significant Difference (HSD) post hoc test. The results obtained in the PDT experiments with several light fluences presented heterocedasticity. The Kruskal-Wallis and a post-hoc Dunn tests were used to detect differences in CFU/mL values among investigated groups. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS\*

### **Absorption and fluorescence of curcumin as a function of illumination time**

Figure 1 presents the absorption and fluorescence spectra changes as a function of illumination fluence. The curcumin solution was illuminated for a total time of 29 min ( $37.5\text{J/cm}^2$ ) and the absorption spectrum was recorded at several illumination time intervals. The ability of curcumin to absorb light decreased progressively as the illumination time was increased, indicating induced photobleaching. The area of the entire absorption spectrum (250nm – 800nm) was integrated and normalized by the area of the non-illuminated spectrum ( $t=0$ ). Therefore, the decrease in optical species that absorb in the visible spectrum could be investigated. Figure 2 shows the calculated photobleaching rate of the curcumin molecules. After a fluence of  $0.4\text{J/cm}^2$  delivered to the curcumin solution being investigated, approximately 70% of the curcumin molecules had already been photobleached, showing their high degradation rate. This result was confirmed by the fluorescence spectra, which also showed low fluorescence emission of the curcumin solution at higher illumination time intervals.

### **Photoinactivation of *C. albicans* suspensions**

As mentioned earlier in this article, initial experiments evaluated a range of nine different curcumin concentrations against *C. albicans*. The mean CFU/mL values obtained are illustrated in Fig. 3A. In comparison with the control

---

\* Os resultados originais e análises estão apresentados no Apêndice (Item7.1).

### 3.1 Capitulo 1

condition (P-L-), a significant reduction in *C. albicans* viability was observed after PDT and the decrease in CFU/mL values was dependent on the PS concentration used. The three highest curcumin concentrations (5, 10 and 20 $\mu$ M) were the most effective for photodynamic action and complete killing of the microorganism was achieved with curcumin at 20 $\mu$ M (37.5J/cm<sup>2</sup> of LED light). Substantial microbial growth was observed on plates subjected to the conditions of P-L- and P+L- (Fig. 3B). Data analysis showed no significant differences among these groups.

The second part of the microbiological experiments evaluated low light fluences for photodynamic inactivation of *C. albicans*. The distribution of CFU/mL values is summarized and presented in box plot format (Fig. 4). Complete inactivation of the yeast was observed with curcumin at 20 $\mu$ M and the minimum light fluence required for this outcome was 5.28J/cm<sup>2</sup>. The results of the Kruskal-Wallis nonparametric analysis indicated statistically significant differences in CFU/mL values and the results of the post hoc analysis are displayed in Table 1. For each curcumin concentration tested, there were no significant changes in CFU/mL values among the illumination fluences of 5.28, 6.60, 13.20 and 26.4 J/cm<sup>2</sup> ( 4, 5, 10 and 20 min, respectively).

Table 2 shows the effect of PIT variations on the viability of *C. albicans*. All PIT tested were able to reduce *C. albicans* viability after PDT, when compared with the log(CFU/mL) value of the control samples (approximately 6 log). When curcumin was still present in the bulk solution during illumination, the PITs starting at 5 minutes were able to promote complete killing of yeast. On the other hand, washing unbound curcumin before illumination revealed that not even the PIT of 20 minutes was able to inactivate the yeast.

The addition of NaN<sub>3</sub> solution, at the three concentrations tested, did not cause any changes in PDT effectiveness, in comparison with the samples without the use of the singlet oxygen suppressor. This result was verified since PDT mediated by curcumin at 20 $\mu$ M promoted complete inactivation of *C. albicans* even with the presence of NaN<sub>3</sub>.

### 3.1 Capitulo 1

#### **Photoinactivation of *C. albicans* biofilms**

The susceptibility of *C. albicans* biofilms to lethal photosensitization is shown in Table 3. In comparison with the control group, a statistically significant decrease in metabolic activity (XTT assay) was observed for all curcumin concentrations tested. A direct relationship between curcumin concentration and biofilm viability was observed. That is, as the concentration increased the metabolism/viability decreased. The effect of PIT on PDT effectiveness was noticeable, as higher percentages of reduction were achieved when biofilms were incubated for 20 minutes before irradiation.

#### **Effect of PDT against macrophage culture**

Figure 5 shows the mean values of MTT obtained after experiments with the macrophage cell line. Considering the negative control group (P-L-) as having 100% cell viability, a significant reduction in cell metabolism of 7.13, 17.22, 82.51, 73.26 and 86.39% was observed for curcumin concentrations of 0.5, 1, 5, 10 and 20 $\mu$ M respectively, when the cells were irradiated with blue LED. On the other hand, PDT mediated by lower curcumin concentrations increased the cell metabolism by 26.95, 32.88, 33.18 and 15.01% (concentrations of 0.005, 0.01, 0.05 and 0.1 respectively). In the P+L+ groups, there was no statistically significant difference ( $p>0.05$ ) among the curcumin concentrations of 5, 10 and 20 $\mu$ M. No dark toxicity of curcumin was observed for the concentrations tested, but the exposure to LED alone (P+L- or P-L+ groups) resulted in the increase of cell metabolism.

Figure 6 (a-f) presents a panel of SEM micrographs of the RAW 264.7 cell-line representative of the control and experimental groups. For the negative control group (P-L-) and groups in which the cells were submitted to irradiation or curcumin (20  $\mu$ M) application, a number of macrophages remained attached to the glass substrate. These cells exhibited a round shape and fine cytoplasmic processes originated from the cell membrane which was characterized a granular appearance (Figure 6a-c). In the groups submitted to PDT with curcumin

### 3.1 Capitulo 1

concentrations ranging from 0.005 to 1 $\mu$ M, cell morphology remained similar to that observed in the negative control group (Figure 6d). However, in PDT groups with curcumin concentrations ranging from 5 to 20 $\mu$ M, a reduced number of small-sized cells remained attached to the glass substrate. These cells were shown to have a smooth membrane from which a number of globular projections originated (Figure 6e and f).

### DISCUSSION

To investigate the antifungal effect of PDT mediated by curcumin, this natural compound was associated with irradiation using blue LED. Complete inactivation of the planktonic form was observed with curcumin at 20 $\mu$ M (which corresponds to 7.4mg/L) associated with low fluences (starting with 4 minutes of illumination or 5.28J/cm<sup>2</sup>). To our knowledge there is no previously published study investigating the photodynamic effects of curcumin against *C. albicans*. However, the antifungal properties of curcumin *per se* have been suggested by some authors. Martins et al. (18) showed that 64mg/L of curcumin was the minimum inhibitory concentration (MIC) that did not allow for the detection of any visual growth of *C. albicans*. Broth microdilution drug susceptibility assays were used by Sharma et al. (23) who verified inhibition of *Candida* cell growth after concentrations  $\geq$ 185mg/L, while higher concentrations (296-370mg/L) were needed to inhibit the growth in solid media. Another investigation tested a range of curcumin concentrations (1.56 – 12.5g/L) against *C. albicans* and showed that with the increase in drug concentration, cell division was apparently inhibited, according to a proliferation index (31). The results of these investigations demonstrated that curcumin alone can act as an antifungal drug, however, the concentration at which it would be effective appears to be much higher when compared with the concentrations used in the present investigation (curcumin was associated with blue light). In the present study, the effectiveness of curcumin for inactivating the yeast was observed only when it was used in conjunction with LED light. This is probably due to the low concentration used for photoinactivation, and the use of curcumin alone involves higher concentrations



### 3.1 Capitulo 1

of the compound to achieve the same killing effect. A similar observation was reported by Dahl et al. when *Salmonella typhimurium* killing was achieved using 10 $\mu$ M of curcumin in association with light, with no curcumin toxicity being observed in the absence of light (32). Tønnesen et al. (33) also showed that the antibacterial activity of curcumin is greatly enhanced by light.

The PIT is a variable that may affect the uptake of the PS by the microbial cell and thus affect inactivation of the yeast (34,35). Jackson et al. (34) reported that killing of the yeast form of *C. albicans* on exposure to toluidine blue (TBO) and light was dependent on the PIT used. In agreement, Wilson and Mia (35) reported that *C. albicans* survival markedly decreased with an increase in PIT with TBO and methylene blue in the range of 1-3 min. However, the same authors also verified that a further increase in the PIT (longer than 3 min) did not increase the number of microorganisms killed. The results of the present study showed that the effectiveness of PDT in inactivating *C. albicans* was not influenced by a PIT longer than 5 minutes, in the samples in which curcumin was still present in the bulk solution during illumination. However, when the PS was washed out, complete inactivation of *Candida* was not achieved (even with 20 minutes of PIT). Similar results were found by Dahl et al. (32) who showed that pre-irradiation with curcumin had no significant effects on the rates of microbial killing but the killing effect was reduced by removing the curcumin before illumination. These observations suggest that the photodynamic effect is greatly increased by the presence of curcumin in the surrounding media. However, it seems that this PS can also bind to the yeast cells to promote photoinactivation. In this case, the PIT seems to play an important role in PDT effectiveness because higher incubation periods before illumination showed higher levels of photoinactivation. Fluorescence microscopic investigation conducted by Hauvik et al. (36) confirmed that it is possible for the uptake/absorption of curcumin by both gram-positive and gram-negative bacteria to occur. Thus, the present investigation suggests that the uptake of curcumin appears to be present in yeast cells as well, but further studies are required to determine whether the PS remains adhered to the outer membrane or whether it could enter into the cell.

### 3.1 *Capítulo 1*

The ability of curcumin to act as an antifungal agent against *C. albicans* biofilms has previously been reported, but without combination with light (37). In the present study, PDT mediated by curcumin proved to be effective in promoting significant reductions in the metabolic activity of *C. albicans* biofilms. Using the same protocol that promoted complete inactivation of the planktonic cells (20 $\mu$ M/20 min PIT/5.28J/cm<sup>2</sup>), the metabolic activity of biofilms was reduced in 70%, which was statistically significant in comparison with control samples. When the concentration of curcumin was increased to 40 $\mu$ M, PDT was able to reduce the metabolic activity of biofilms to 68 and 87%, for 5 and 20 min of PIT respectively. Based on these results, it can be suggested that PIT is also a significant factor in biofilms killing. These findings can be explained by the structural characteristics of biofilms grown cells (38,39,40). Biofilms consist of a community of microorganisms surrounded by a self-produced polymeric matrix and this typical structure provides survival advantage to the microorganisms living within these communities (39). Some PS may have limited ability to act against the biofilms, due to the difficulty of penetrating into the deeper layers of microorganisms (24). Scanning electron microscopy images from the study of Pereira et al. (41) showed that lethal photosensitization mediated by methylene blue occurred predominantly in the outermost layers of the biofilms formed with *C. albicans*, *S. aureus*, and *S. mutans*. The results of the present investigation suggest that longer PITs were able to allow deeper penetration of the curcumin into the biofilm layers leading to higher percentages of metabolic reduction. Accordingly, Donnelly et al. (42) recommended longer application times of PS to obtain PDT response when biofilms were involved. In addition, Chabrier-Roselló et al. (43) reported the use of higher PS concentrations to compensate the increased organism biomass of *C. albicans* biofilms in comparison with germ tubes.

Some authors have suggested that curcumin has antibacterial action when associated with light (32,33,36). For instance, photokilling of gram-positive *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus intermedius* and gram-negative *Escherichia coli* were observed after treatment with 1-25 $\mu$ M curcumin and blue

### 3.1 Capitulo 1

light illumination at  $0.5\text{-}30\text{J}/\text{cm}^2$  (36). The curcumin-phototoxicity to bacterial systems seems to be mediated through the excited states of curcumin and their subsequent reactions with oxygen (44). Recently, Shen et al. (45) investigated the photosensitizing mechanisms of curcumin according to the type of solvent used. It was shown that both superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ) and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) was generated after curcumin was photosensitized in DMSO solution (45). It was also stated that once  $\text{O}_2^-$  was formed, other reactive species, such  $\text{H}_2\text{O}_2$  could be produced and then amplify the photosensitizing activity of curcumin (45). On the other hand, an investigation that evaluated curcumin as a PS suggested the involvement of hydrogen peroxide in the photokilling of bacteria and no evidence of  $^1\text{O}_2$  formation (32). In the present investigation, the possible involvement of singlet oxygen was assessed by adding  $\text{NaN}_3$  to the samples, before illumination. *C. albicans* killing was not affected by the presence of the  $^1\text{O}_2$  scavenger, indicating that this reactive species was not essential in promoting the photodynamic effect. Hauvik et al. (36) measured the oxygen quantum yield in different curcumin preparations and found very limited  $^1\text{O}_2$  formation. This is consistent with the findings of Dahl et al (46) which showed little or no  $^1\text{O}_2$  generation when protic solutions are involved. In the present study, an aprotic solvent (DMSO) was used to prepare the stock solutions of curcumin, however, the stock solutions were then diluted in saline solution (a protic solvent), leading to a final DMSO concentration of only 10% in the solutions. Thus, the curcumin solutions exposed to light consisted largely of an aqueous/protic environment and this may possibly explain the lack of  $^1\text{O}_2$  production. However, the PIT results and the uptake data tend to support the hypothesis that curcumin could bind to the cells during pre-irradiation and then protic and aprotic mechanisms could occur simultaneously. Aprotic mechanisms could occur in the lipophilic phases of the cytoplasmatic membrane and singlet oxygen may be formed inside the yeast cell, as suggested by Hauvik et al. (36). The results of the present study revealed that the induced photodynamic reaction may not be essentially related to the production of singlet oxygen, but its mechanism, as the production of other reactive components, still need to be determined in future investigations.

### 3.1 *Capítulo 1*

In the present study, the microbiologic investigation showed that light fluences above  $5.28\text{J}/\text{cm}^2$  did not enhance the effectiveness of PDT against planktonic cultures of *C. albicans*. This result was corroborated by the observation that the light absorption and fluorescence of curcumin decreased as a function of illumination time (light fluence). The spectral changes monitored were a measurement of the induced photobleaching of the curcumin molecules, and this has been used as an indirect measurement of the potential photodynamic response. This type of analysis has been used to compare the photodynamic efficiency of different sensitizers and experimental studies have shown a correlation between reactive oxygen species (ROS) production and induced photobleaching of the photosensitizer molecules. Thus, based on the high photobleaching rate of curcumin observed, it can be suggested that low levels of ROS formation were achieved after long periods of illumination. Chignell et al. (47) also showed that the absorbance of curcumin decreased after illumination indicating that the dye was photobleached. Although the authors did not evaluate curcumin solutions in DMSO, it was stated that curcumin photodegradation appears to be a process independent of the nature of the solvent, and that photodegradation did not produce a better sensitizer than curcumin itself. Thus, it can be suggested that curcumin photobleaching may be accompanied by a decrease in ROS production, since fewer molecules of optically active curcumin in the visible spectrum will be present at the solution. This could explain the results observed in the present investigation when, as a result of curcumin photobleaching, irradiation fluences higher than  $5.28\text{J}/\text{cm}^2$  did not influence the phototoxic efficiency of curcumin against *C. albicans*. Nevertheless, in spite of the occurrence of photodegradation, the absorption and fluorescence peak of curcumin remained constant at the same wavelength during illumination. Thus, if curcumin photodegradation caused the accumulation of photoproducts, it may be suggested that these products could not be detected in the interrogated spectral range.

Considering that curcumin mediated PDT proved to be effective for *C. albicans* inactivation, a range of nine curcumin concentrations combined with  $5.28\text{J}/\text{cm}^2$  was tested against a macrophage cell line to verify its toxicity. The

### 3.1 Capitulo 1

association of curcumin (1 $\mu$ M or higher) and light produced a significant reduction in macrophage metabolism, in comparison with control samples. The effect of curcumin without illumination was also evaluated and the results showed no statistical reduction in cell viability. Macrophages are multifunctional immune cells responsible for many of the host responses to candidiasis (48). For this reason, it is important to verify a possible toxic effect of an antifungal therapy against these defense cells (49). A previous investigation has suggested that curcumin associated with light can be phototoxic to mammalian cells (46). On the other hand, curcumin has also been reported to selectively lead to apoptosis in various cancer cells without affecting normal and primary cells (50). In the present investigation PDT did not cause complete inhibition of RAW cells, while the same protocol (20 $\mu$ M/5.28J/cm<sup>2</sup>) was able to completely inactivate planktonic *C. albicans*. This suggests that *C. albicans* may be more susceptible to PDT than the macrophages. The clinical relevance of these results needs to be further investigated by means of in vivo evaluations, since photodynamic toxic effects can be influenced by microenvironment conditions, the presence of other biomolecules and cellular interactions. It has been shown that while in vitro PDT can lead to damage in fibroblasts (51), a similar protocol did not induce damage in mouse tissues (14). Since the preliminary in vitro findings of this study have shown that PDT was more effective in inactivating the yeast cell than the defense cell, we believe that an in vivo investigation will probably confirm lower phototoxicity of PDT against the defense cells.

In conclusion, when curcumin was irradiated with blue LED light, it proved to be an effective photosensitizing agent for the inactivation of *C. albicans*, in both planktonic and biofilm form. The results of the present study showed that better outcomes were achieved with the association of curcumin and light, instead the use of curcumin alone. Although it is possible for the uptake of curcumin to occur during pre-irradiation, the photodynamic effect is greatly increased with the presence of curcumin in the surrounding media. The high photodegradation rate of the preparation used indicated that short periods of illumination are adequate for photoactivating the dye and causing the phototoxic

### 3.1 Capitulo 1

effects. Although PDT was phototoxic to macrophages, this therapy was more effective in inactivating the yeast cell than the defense cell. Shortly, further studies will be developed to evaluate the curcumin mediated-PDT against fungal infections in an animal model in order to establish effective in vivo parameters for candidiasis treatment without harming the host's normal tissues.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank Olympio Teixeira Neto for help with the statistical analysis of data and DEMA/ UFSCar for assistance with the SEM imaging. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, grants FAPESP 2008/03994-9 and 2008/00601-6; and CEPID Program 98/14270-8.

### REFERENCES

1. Neppelenbroek, K. H., N. H. Campanha, D. M. Spolidorio, L. C. Spolidorio, R. S. Seó, and A. C. Pavarina (2006) Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis.* 12, 242-253.
2. Samaranayake L.P. and T.W. MacFarlane (1990) *Oral Candidosis*. Wright-Butterworth, London, UK.
3. Webb, B. C., C. J. Thomas, M. D. Willcox, D. W. Harty, and K. W. Knox (1998) *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust. Dent. J.* 43, 160-166.
4. Sullivan, D., K. Haynes, J. Bille, P. Boerlin, L. Rodero, S. Lloyd, M. Henman, and D. Coleman (1997) Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* 35, 960-964.
5. Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, and R. P. Gaynes (1999) Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.* 27, 887-892.

### 3.1 *Capítulo 1*

6. Pittet, D., M. Monod, P. M. Suter, E. Frenk, and R. Auckenthaler (1994) *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann. Surg.* 220, 751–758.
7. Vincent, J. L., D. J. Bihari, P. M. Suter, H. A. Bruining, J. White, M. H. Nicolas-Chanoin, M. Wolff, R. C. Spencer, and M. Hemmer (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA.* 274, 639-644.
8. Peres-Bota, D., H. Rodriguez-Villalobos, G. Dimopoulos, C. Melot, and J. L. Vincent (2004) Potential risk factors for infection with *Candida* spp. in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 550-555.
9. Pittet, D., D. Tarara, and R. P. Wenzel (1994) Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA.* 271, 1598–1601.
10. Hunter, K. D., J. Gibson, P. Lockhart, A. Pithie, and J. Bagg (1998) Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85, 558-564.
11. White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 382-402.
12. Rex, J. H., M. G. Rinaldi, and M. A. Pfaller (1995) Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1-8.
13. Henderson, B. W., and T. J. Dougherty (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145-157.
14. Mima, E. G., A. C. Pavarina, L. N. Dovigo, C. E. Vergani, C. A. Costa, C. Kurachi, and V. S. Bagnato (2010) Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 109, 392-401.

### 3.1 *Capítulo 1*

15. Hamblin, M. R., and T. Hasan (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 3,436-450
16. Donnelly, R. F., P. A. McCarron, and M. M. Tunney (2008) Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.* 163, 1-12.
17. Epstein, J., I. R. Sanderson, and T. T. Macdonald (2010) Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br. J. Nutr.* 26, 1-13.
18. Martins, C. V., D. L. da Silva, A. T. Neres, T. F. Magalhães, G. A. Watanabe, L. V. Modolo, A. A. Sabino, A. de Fátima, and M. A. de Resende (2009) Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 337-339.
19. Bruzell, E. M., E. Morisbak, and H. H. Tønnesen (2005) Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4,523-530.
20. Dujic, J., S. Kippenberger, A. Ramirez-Bosca, J. Diaz-Alperi, J. Bereiter-Hahn, R. Kaufmann, A. Bernd, and M. Hofmann (2009) Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int. J. Cancer.* 124, 1422-1428.
21. Haukvik, T., E. Bruzell, S. Kristensen, and H.H. Tønnesen (2011) A screening of curcumin derivatives for antibacterial phototoxic effects studies on curcumin and curcuminoids. XLIII. *Pharmazie.* 66, 69-74.
22. Hegge A.B., T. Andersen, J.E. Melvik, E. Bruzell, S. Kristensen, and H.H.Tønnesen (2011) Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoides XLII. *J. Pharm.* 100, 174-85
23. Sharma, M., R. Manoharlal, N. Puri, and R. Prasad (2010) 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.* 30, 391-404.



### 3.1 *Capítulo 1*

24. Dovigo, L. N., A. C. Pavarina, E. G. de Oliveira Mima, E. T. Giampaolo, C. E. Vergani, and V. S. Bagnato (2011) Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 54, 123-30.
25. Schmidt, R (1989) Influence of heavy atoms on the deactivation of singlet oxygen (1.DELTA.g) in solution. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6983–6987.
26. Cavalcante, R., H. Imasato, V. Bagnato and J. Perussi (2009) A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Physics Letters*. 6, 64–70.
27. Jin, Y., H.K. Yip, Y.H. Samaranayake, J.Y. Yau, L.P. Samaranayake (2003) Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2961-2967.
28. Melo, A.S., A.L. Colombo, B.A. Arthington-Skaggs (2007) Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3081-3088.
29. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55–63.
30. Ferreira, J., P. F. C. Menezes, C. H. Sibat, R. R. Allison, S. Zucoloto, O. Castro e Silva Jr., and V.S. Bagnato (2009) Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? *Laser Physics*. 19, 1932–1938.
31. Jianhua, W., and W. Hai (2009) Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. *Journal of Medical Colleges of PLA*. 24, 142–147.
32. Dahl, T. A., W. M. McGowan, M. A. Shand, and V. S. Srinivasan (1989) Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch. Microbiol.* 151, 183-185.

### 3.1 Capitolo 1

33. Tønnesen, H. H., H. de Vries, J. Karlsen, and G. Beijersbergen van Henegouwen (1987) Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J. Pharm. Sci.* 76, 371-373.
34. 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.
35. Wilson, M., N. Mia (1994) Effect of environmental factors on the lethal photosensitisation of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med. Sci.* 9, 105–109.
36. Haukvik, T., E. Bruzell, S. Kristensen, and H. H. Tønnesen (2009) Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie.* 64, 666-673.
37. Kassab, N.H., E.A. Mustafa, and M.T. Al-Saffar (2007) The ability of different curcumine solutions on reducing *Candida albicans* biofilm activity on acrylic resin denture base material. *Al-Rafidain Dent. J.* 7, 32–37.
38. 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.
39. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
40. Sharma, M., L. Visai, F. Bragheri, I. Cristiani, P.K. Gupta, and P. Speziale (2008) Toluidine blue-mediated photodynamic effects on Staphylococcal biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 299-305.
41. Pereira, C.A., R.L. Romeiro, A.C. Costa, A.K. Machado, J.C. Junqueira, and A.O. Jorge (2010) Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med. Sci.* 2010 in press.
42. Donnelly, R.F., P.A. McCarron, M.M. Tunney, and A. David Woolfson (2007) Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of

### 3.1 Capitulo 1

- the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J. Photochem. Photobiol. B* 86, 59-69.
43. Chabrier-Roselló, Y., T.H. Foster, S. Mitra, and C.G. Haidaris (2008) Respiratory deficiency enhances the sensitivity of the pathogenic fungus *Candida* to photodynamic treatment. *Photochem. Photobiol.* 84, 1141-1148.
  44. Priyadarsini, K. I. (2009) Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J. Photochem. Photobiol. C, Photochem.* 10, 81-95.
  45. Shen, L., H. F. Ji, and H. Y. Zhang (2005). 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.* 409, 300-303.
  46. Dahl, T.A., P. Bilski, K.J. Reszka, and C.F. Chignell (1994) Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem. Photobiol.* 59, 290-294.
  47. Chignell, C. F., P. Bilski, K. J. Reszka, A. G. Motten, R. H. Sik, and T. A. Dahl (1994) Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol.* 59, 295-302.
  48. Vázquez-Torres, A., and E. Balish (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 170-192.
  49. Benko, I., F. Hernádi, A. Megyeri, A. Kiss, G. Somogyi, Z. Tegye, F. Kraicsovits, P. Kovács (1999) Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 675-681.
  50. Weng, C. H., B. Y. Yung, J. J. Weng, and M. H. Wu (2010) Involvement of nucleophosmin/B23 in the cellular response to curcumin. *J. Nutr. Biochem.*, in press.
  51. Ribeiro, A.P., A.C. Pavarina, F.Z. Trindade, N.M. Inada, V.S. Bagnato, and C.A. de Souza Costa (2010) Photodynamic therapy associating Photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. *Cell Biol. Int.* 34, 343-351.

## 3.1 Capitulo 1

**TABLES**

Table 1- Post hoc multiple comparisons for the association of three curcumin concentrations with seven light fluences against *C. albicans*. The values given are the ranks calculated by the non-parametric statistics.

Curcumin concentrations	Light fluences (J/cm <sup>2</sup> )						
	1.32	2.64	3.96	5.28	6.6	13.2	26.4
5µM	102.80 <sup>a</sup>	83.00 <sup>ab</sup>	85.70 <sup>ab</sup>	77.30 <sup>b</sup>	68.70 <sup>b</sup>	74.10 <sup>b</sup>	66.70 <sup>b</sup>
10µM	87.20 <sup>a</sup>	67.90 <sup>ab</sup>	58.30 <sup>bc</sup>	39.70 <sup>cd</sup>	41.00 <sup>cd</sup>	33.30 <sup>d</sup>	41.00 <sup>cd</sup>
20µM	50.90 <sup>a</sup>	46.10 <sup>a</sup>	25.30 <sup>b</sup>	16.00 <sup>b</sup>	16.00 <sup>b</sup>	16.00 <sup>b</sup>	16.00 <sup>b</sup>

The same lower case letter in the same horizontal row denotes non-significant differences ( $p > 0.05$ ) among the groups; different lower case letters in the same row indicate significant differences according to non-parametric post hoc test ( $p < 0.05$ ).

Table 2- Effect of different PIT on *C. albicans* viability. The given values were the mean log(CFU/mL) of *C. albicans*  $\pm$  the standard deviation obtained after PDT.

	5 min PIT	20 min PIT
20µM Curcumin	–	–
20µM Curcumin cells washed	2.10 $\pm$ 0.17	0.60 $\pm$ 0.79

–: no evidence of colony growth was observed after PDT.

3.1 *Capitulo 1*

Table 3- Metabolic activity of *C. albicans* biofilms after PDT with different curcumin concentrations. The given values were the absorbance mean (XTT)  $\pm$  the standard deviation. The percentage of reduction of metabolic activity obtained after PDT was calculated versus the absorbance value obtained with P-L- group.

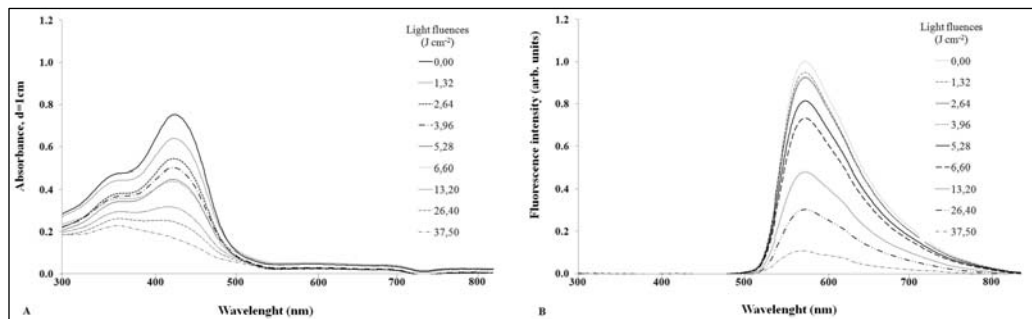
	PIT 5 min		PIT 20 min	
	XTT $\pm$ SD	% of Reduction	XTT $\pm$ SD	% of Reduction
<b>P-L-</b>	0.963 $\pm$ 0.080 <sup>a</sup>	NA	0.963 $\pm$ 0.080 <sup>a</sup>	NA
<b>PDT 5<math>\mu</math>M</b>	0.725 $\pm$ 0.114 <sup>b</sup>	24.67	0.678 $\pm$ 0.114 <sup>b</sup>	29.55
<b>PDT 10<math>\mu</math>M</b>	0.518 $\pm$ 0.065 <sup>c</sup>	46.26	0.399 $\pm$ 0.038 <sup>c</sup>	58.58
<b>PDT 20<math>\mu</math>M</b>	0.449 $\pm$ 0.064 <sup>cd</sup>	53.40	0.284 $\pm$ 0.071 <sup>d</sup>	70.51
<b>PDT 30<math>\mu</math>M</b>	0.356 $\pm$ 0.060 <sup>de</sup>	63.01	0.220 $\pm$ 0.062 <sup>de</sup>	77.12
<b>PDT 40<math>\mu</math>M</b>	0.306 $\pm$ 0.058 <sup>e</sup>	68.19	0.123 $\pm$ 0.056 <sup>e</sup>	87.22

Different lower case letters denote significant differences among lines (PDT treatments) according to Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

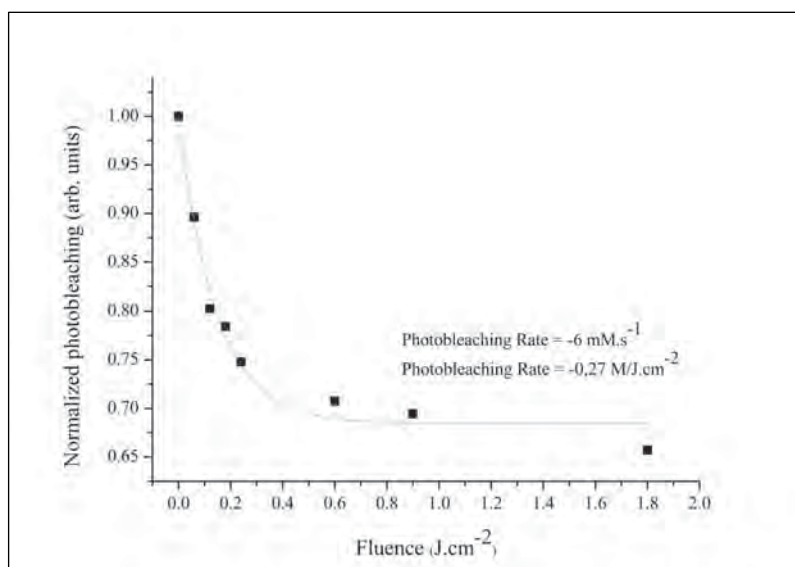
NA, not applicable.

## 3.1 Capitulo 1

## FIGURES

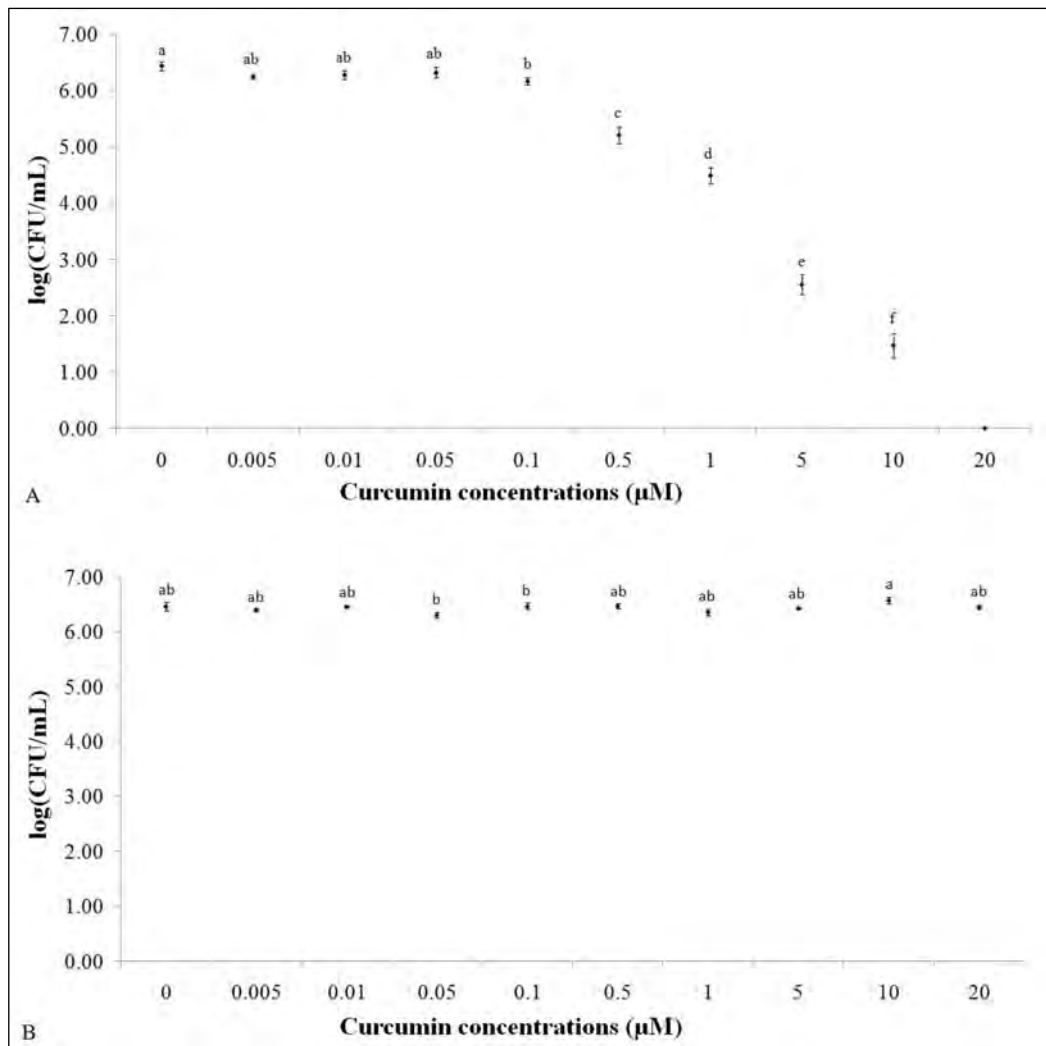


**Figure 1.** Spectra of 20 μM-curcumin as a function of illumination fluence. A: Absorption spectra; B: Fluorescence spectra.



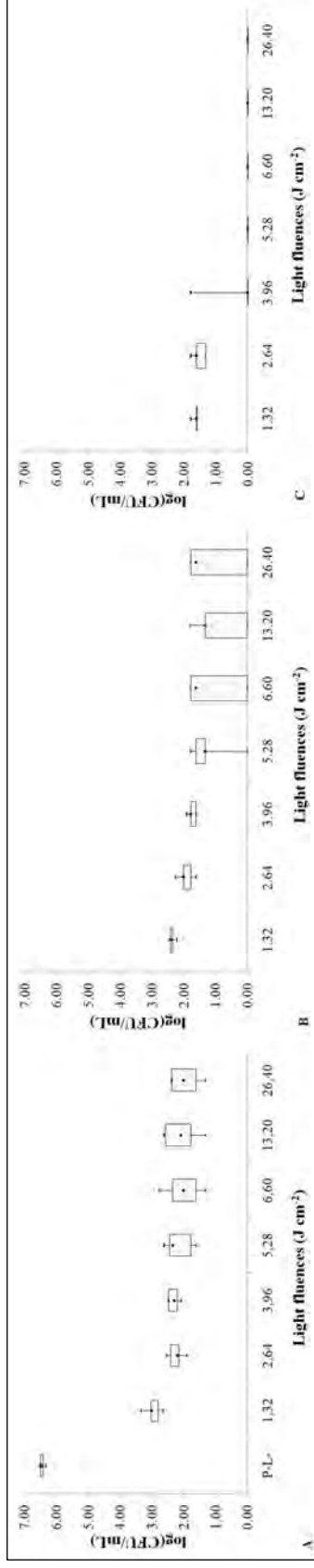
**Figure 2.** Calculated photobleaching rate of the curcumin molecules.

## 3.1 Capítulo 1



**Figure 3.** Graphic representation of mean values and standard deviation of logarithmic of survival counts (CFU/mL) of *C. albicans*. The light fluence used was 37.5J/cm<sup>2</sup>. A: P+L+ conditions; B: P+L- conditions.

## 3.1 Capitulo 1

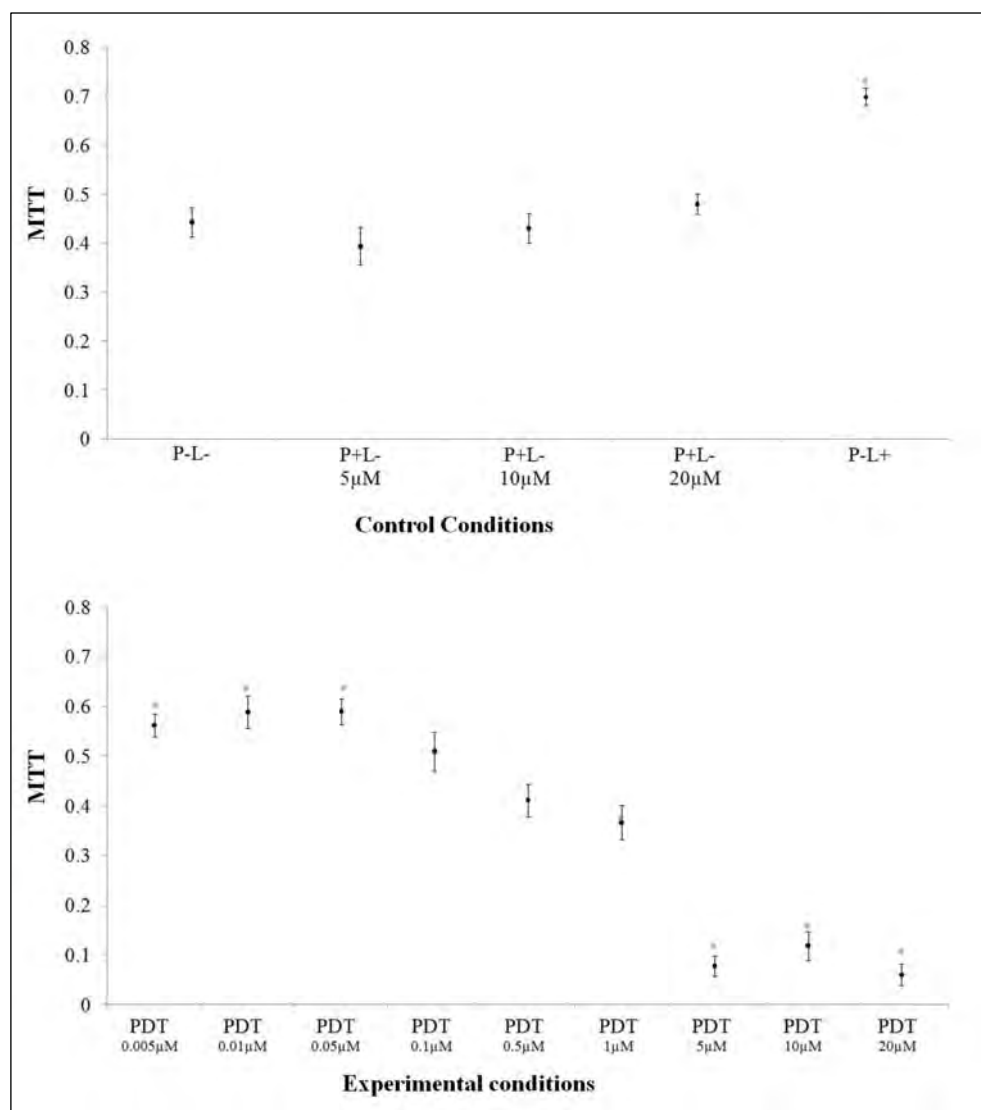


**Figure 4.** Summary of CFU/mL values obtained after the association of three curcumin concentrations and seven LED light against

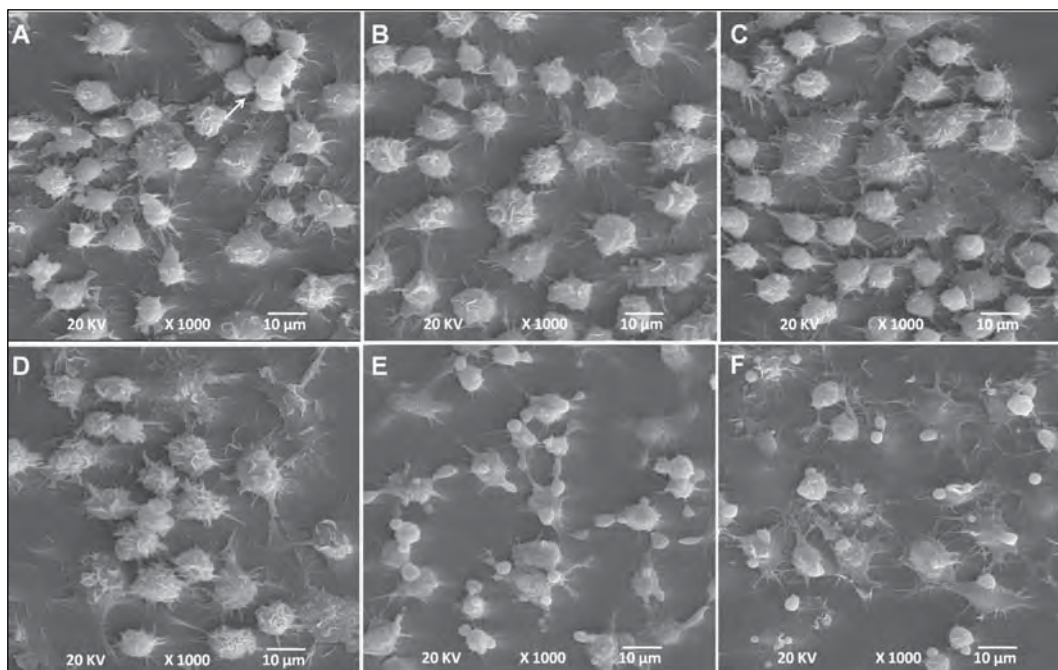
*C. albicans*. A: curcumin at 5 μM; B: curcumin at 10 μM; C: curcumin at 20 μM.



## 3.1 Capítulo 1



**Figure 5.** Mean values of MTT observed after experiments with the RAW 264.7 macrophages. Error bars represent the confidence interval ( $\alpha=0.05$ ); asterisks represent the mean values that differed statistically from control (P-L-) samples ( $p<0.05$ ).

3.1 *Capitulo 1*

**Figure 6.** Representative photomicrographs of, SEM, 1000X. a- Negative control group of RAW 264.7 cell line (P-L-); b- RAW 264.7 macrophages exposed to light with the energy density of  $5.28\text{J}/\text{cm}^2$  (P-L+); c- Macrophages in contact with curcumin at  $20\mu\text{M}$  (P+L-  $20\mu\text{M}$ ); d- RAW 264.7 macrophages exposed to PDT with  $0.005\mu\text{M}$  of curcumin (PDT  $0.005\mu\text{M}$ ); e- RAW 264.7 macrophages exposed to PDT with  $5\mu\text{M}$  of curcumin (PDT  $5\mu\text{M}$ ); f- RAW 264.7 macrophages exposed to PDT with  $20\mu\text{M}$  of curcumin (PDT  $20\mu\text{M}$ ).

## 3.2 *Capítulo 2*

### **Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin\***

Short Title: Photodynamic effects of Curcumin against *Candida* spp.

Lívia N. Dovigo, MSc

Ana C. Pavarina<sup>†</sup>, PhD

Juliana C. Carmello, MSc

Ana L. Machado, PhD

Iguatemy L. Brunetti, PhD

Vanderlei S. Bagnato, PhD

Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil,  
14801-903 (LND, ACP, JCC, ALM)

School of Pharmaceutics Sciences, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP,  
Brazil, 14801-902 (ILB)

Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo – USP, São Carlos, SP, Brazil,  
13566-250 (VSB)

**Acknowledgments:** We thank Olympio Teixeira Neto for help with the statistical analysis of data. We also thank Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima for assistance with the identification of *Candida* isolates. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, grants FAPESP 2008/03994-9 and 2008/00601-6.

<sup>†</sup> **Corresponding author:** Dr Ana Cláudia Pavarina / e-mail: pavarina@foar.unesp.br

Adress: Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, nº 1680 –

CEP: 14801-903, Araraquara, SP, Brasil

Phone: #55#016#33016410 / Fax: #55#016#33016406

---

\* Artigo submetido e aceito para publicação no periódico **Lasers in Surgery and Medicine** (Anexo 2)

## 3.2 Capítulo 2

**Key-words:** *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, Photodynamic therapy, Turmeric

### ABSTRACT

**Background and Objective:** The resistance of *Candida* species to antifungals represents a major challenge for therapeutic and prophylactic strategies. This study evaluated Photodynamic Therapy (PDT) mediated by Curcumin (Cur) against clinical isolates of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, both in planktonic and biofilm forms. **Study Design/Materials and Methods:** Suspensions of *Candida* were treated with three Cur concentrations and exposed to four LED fluences. The protocol that showed the best outcomes for inactivation of the planktonic phase was selected to be evaluated against *Candida* biofilms. In addition, two higher Cur concentrations were tested. The metabolic activity of biofilms was evaluated by means of XTT reduction assay and the biofilm biomass was evaluated using Crystal Violet (CV) staining assay. Data were analyzed in a mixed model nested ANOVA, Wilcoxon's nonparametric tests and the Kruskal-Wallis test ( $\alpha= 5\%$ ). **Results:** The use of Cur in association with light was able to promote a significant antifungal effect against the planktonic form of the yeasts. When using 40 $\mu$ M of Cur, the metabolic activity of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* biofilms was reduced by 85, 85 and 73% respectively, at 18J/cm<sup>2</sup>. Cur-mediated PDT also decreased the biofilm biomass of all species evaluated. In addition, CV staining showed that *C. albicans* isolates were strong biofilm-forming strains, when compared with *C. glabrata* and *C. tropicalis* isolates. **Conclusion:** The results from the present investigation showed that low Cur concentrations can be highly effective for inactivating *Candida* isolates when associated with light excitation.

### INTRODUCTION

In healthy individuals, *Candida* species are considered commensal yeasts of the oral cavity. *Candida albicans* represents the predominant species, while *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* are considered the second most frequent

### 3.2 *Capítulo 2*

(1,2). These microorganisms can also act as opportunist pathogens, being the so-called non-*albicans Candida* species (NAC) increasingly recognized as important agents of human infection. Oropharyngeal candidiasis is the most common opportunistic infection that results from yeast overgrowth and penetration of the oral tissues (3). Some predisposing factors can markedly increase the host's susceptibility to this condition, such as the use of ill-fitting dentures, AIDS and long-term antibiotic therapy (4,5). For immunocompromised individuals, the disseminated forms of candidiasis can be a serious problem, often resulting in high mortality rates (6). A number of surveys have documented increased rates of *C. glabrata* and *C. tropicalis* in systemic fungal infections (6-8). *C. tropicalis* may be of particular concern in these cases because of its high pathogenicity in causing fungaemia (8).

Treatments available for *Candida* infection are typically drug based and can involve topical and systemic antifungal agents (4). However, the use of standard antifungal therapies can be limited because of toxicity, low efficacy rates, and drug resistance (9). In fact, the resistance of NAC to antifungals represents a major challenge for therapeutic and prophylactic strategies (6). Some of these species, such as *C. glabrata*, are inherently less sensitive to fluconazole and other antimycotic drugs frequently used to combat fungal infections. In addition to the intrinsic resistance of some species, different clinical isolates belonging to a single species can vary widely in their susceptibility to antifungal agents (10). This diversity could predispose the selection of more resistant strains and the persistence of the disease (10). Moreover, most manifestations of candidiasis are associated with the formation of *Candida* biofilms on surfaces such as oral tissues, prostheses and implanted devices (9). Biofilms represent a protective reservoir for oral microorganisms that provides survival advantage to the yeast and elevated resistance to antifungal drugs (11). Therefore, the increasing worldwide occurrence of antifungal resistance has driven research to the development of alternative strategies to inactivate *Candida* species and to treat oral candidiasis.

### 3.2 *Capítulo 2*

Photodynamic inactivation of microorganisms is based on the combination of a drug, known as photosensitizer (PS), and the delivery of a visible light of the appropriate wavelength to excite the PS molecule (12). The interactions of the PS in the excited state with oxygen produce cytotoxic species that lead to microbial destruction (12). When compared with other therapies, photodynamic therapy (PDT) has several advantages, such as high target specificity (PS can be delivered to cells and light can be focused on the site of the lesion), few undesired side effects, and little likelihood of leading to the development of resistance by microorganisms (13). For this reason, there has been an increased interest in developing PDT for local infections treatment. Different types of PS have been proposed in laboratory investigations, including porphyrins (14,15), phenothiazine dyes (16,17) chlorins (18,19) and phthalocyanines (20). However, complete killing of the microorganisms is not frequently achieved and some of the available PS showed limited effectiveness against *Candida* biofilms and animal models of candidiasis (15,21). Such facts have driven research to find adequate parameters of PDT prior to clinical investigations and the search for new PSs remains an important goal. Curcumin (Cur) is an intensely yellow pigment, isolated from rhizomes of *Curcuma longa*, which is in worldwide use as a cooking spice, flavoring agent, and colorant (22). An increasing number of investigations have suggested that Cur exhibits potential therapeutic applications that may be enhanced by combination with light, since it displays a high light absorption in the visible spectral region, around 400-500nm (23-26). Recently, this natural compound has been shown to possess phototoxic potential against yeast cells (23). The authors found that Cur was an effective PS for the inactivation of one reference strain of *C. albicans*, in planktonic form. It was also showed that the therapy was more effective in inactivating the yeast cell than a macrophage cell line, suggesting certain specificity of Cur-mediated PDT. However, some aspects need to be further investigated before a clinical recommendation of the therapy, such as the adequate protocol for the effective photosensitization of *Candida* biofilms. As PDT mediated by Cur already showed preliminary results for yeast inactivation, the present study evaluated different PDT protocols against *C.*

### 3.2 Capítulo 2

*albicans* and non-*albicans* species, both in planktonic and biofilms form. Considering the important clinical relevance of investigating more than one isolate belonging to a single species, we evaluated a total of 15 clinical isolates belonging to the species *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*.

#### **MATERIALS AND METHODS**

**Photosensitizer and light source for PDT:** Natural Cur (Fluka Co.) was obtained from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. A stock solution of Cur (600 $\mu$ M) was prepared in DMSO and then diluted in saline solution to obtain the concentrations to be tested. A light emitting diode (LED) based device, composed of eight royal blue LEDs (LXHL-PR09, Luxeon® III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA), was used to excite Cur (23). The LED device provided a uniform emission from 440 to 460nm, with maximum emission at 455nm. The irradiance delivered was of 22mW/cm<sup>2</sup>.

***Candida* strains and grown conditions:** A total of 15 clinical isolates of *Candida* comprising *C. albicans*: Ca1, Ca2, Ca3, Ca4 and Ca5; *C. glabrata*: Cg1, Cg2, Cg3, Cg4 and Cg5; and *C. tropicalis*: Ct1, Ct2, Ct3, Ct4 and Ct5, were used in this study. The strains were previously isolated from patients with oral candidiasis and identified by CHROMagar technique and the carbohydrate assimilation tests (ID 32C-BioMérieux, Paris, France). Isolates were maintained in Yeast-Peptide-Glucose medium and frozen at -70°C. Prior to each experiment, yeasts were aerobically cultured at 37°C for 24h on Sabouraud Dextrose Agar containing 5mg/L gentamicin (SDA).

**Planktonic culture of *Candida* and PDT treatments:** To obtain standardized suspensions of *Candida*, each isolate was individually inoculated in Tryptic Soy Broth, incubated at 37°C, harvested after centrifugation, washed twice and resuspended in sterile saline as previously described (15). Aliquots of 100 $\mu$ l of the standardized suspensions of *Candida* were individually transferred to separate wells of a 96-well microtitre plate. Curcumin solutions were added to the wells to

### 3.2 *Capítulo 2*

give the final concentrations of 5, 10 and 20 $\mu$ M (which correspond to 1.8, 3.7 and 7.4mg/L). After dark incubation for 20 min (pre-irradiation time), the plate was placed on the LED device and illumination was performed at 5.28, 18, 25.5 and 37.5 J/cm<sup>2</sup> (PDT groups). To determine whether Cur alone, at the tested concentrations, induced any effect on cell viability (dark toxicity), additional wells containing the yeast suspensions were exposed to Cur under identical conditions to those described above, but not to LED light (P+L-). The effect of LED light alone was determined by exposing cells to light without being previously exposed to Cur (P-L+). The overall control consisted of *Candida* suspensions not exposed to Cur or LED light (P-L-). Ten-fold serial dilutions of aliquots of the contents of each well were prepared using sterile saline. Duplicate 25 $\mu$ l aliquots were plated on SDA and all plates were aerobically incubated at 37°C for 48 hours. After this, colony counts 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 and transformed into logarithm (log<sub>10</sub>).

***C. albicans* biofilm and PDT treatments:** Based on the results of the experiments reported above, the concentration of Cur (20 $\mu$ M) and light fluencies (5.28 and 18J/cm<sup>2</sup>) that achieved the most promising results against planktonic cultures were selected to be tested toward *Candida* biofilms. In addition, two higher concentrations of Cur were evaluated (30 and 40 $\mu$ M). For in vitro biofilm formation, the isolates were individually inoculated in 5mL of RPMI-1640 medium and incubated overnight in an orbital shaker (AP 56, Phoenix Ind Com Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brazil) at 120rpm, 37°C, for 16h. After incubation, the yeast were washed twice with 5mL of phosphate-buffered saline (PBS), and suspended to 10<sup>7</sup> cells/mL by adjusting the optical density of the suspension to 0.38 at 520nm (27,28). Aliquots of 100 $\mu$ L of the standard cell suspension were transferred into each well of pre-sterilized polystyrene, flat-bottomed 96-well microtiter plates. The plate was incubated at 37°C for 1.5h in an orbital shaker at 75rpm (adhesion phase). After that, the suspensions were



### 3.2 *Capítulo 2*

carefully aspirated, and each well was washed twice with 150 $\mu$ L of PBS to remove non-adherent cells. In order to allow biofilm growth, 150 $\mu$ L of fresh RPMI-1640 was transferred into each well, and the plates were incubated at 37°C for 48h at 75 rpm.

After biofilm formation, the wells were carefully washed twice with 200 $\mu$ L of PBS to remove remaining non-adherent cells. Then, 100 $\mu$ L of Cur was added to each well. The Cur concentrations tested were 20, 30 and 40 $\mu$ M, which corresponded to 7.4, 11.05 and 14.7mg/L. The plates were incubated in the dark for 20 min, followed by illumination of 5.28 and 18J/cm<sup>2</sup>. Control wells received PBS instead of Cur solution and samples were not illuminated (P-L-).

The antifungal effects against the biofilms were evaluated by a metabolic assay based on the reduction of XTT, a tetrazolium salt (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). To prepare the XTT solution, the salt was dissolved in PBS (1mg/mL) and stored at -70°C. For each experiment, 158 $\mu$ L of PBS prepared with glucose at 200mM, 40 $\mu$ L of XTT plus 2 $\mu$ L of menadione at 0.4mM were mixed and transferred to each well. The plates were incubated in the dark at 37°C for 3h. After this, 100 $\mu$ L of the reacted XTT salt solution was transferred to a new 96-well microtiter 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.

In order to evaluate whether PDT could cause the detachment of *Candida* biofilms from the plastic surface, the quantification of the cells adhered to the wells was performed by means of Crystal Violet (CV) assay (27). For this purpose, additional samples from P-L- and PDT groups (40 $\mu$ M of Cur with 18J/cm<sup>2</sup> of illumination) were included in this evaluation. The biofilm coated wells of microtiter plates were washed twice with 200 $\mu$ L of PBS and then air dried for 45 min at room temperature. Then, each of the washed wells was stained with 110 $\mu$ L of 0.4% aqueous CV solution for 45 min. Afterwards, each well was washed three times with 200 $\mu$ L of sterile distilled water and immediately destained with 200 $\mu$ L of 95% ethanol. After 45 min at room temperature, 100 $\mu$ L of the destaining solution was transferred to a new well and the amount of the CV

### 3.2 Capítulo 2

stain was measured with a microtiter plate reader (BIO-RAD, model 3550-UV, microplate reader, Hercules, CA, USA) at 595nm.

**Statistical analysis:** For each *Candida* isolate, the experimental treatments (PDT, P+L- and P-L-) were tested in five independent samples. Descriptive analysis was performed to summarize the results of each *Candida* isolate. Then, the results from the five isolates of the same species were joined to obtain a general response of the species. Data from colony counts and XTT assay were analyzed in a mixed model nested ANOVA: experimental (PDT) and control (P+L-, P-L+, and P-L-) groups were treated as fixed factors, whereas the five *Candida* isolates were random factors nested within groups. The test was based on the assumption of a linear model with errors normally distributed around zero with corrected variance between groups to fit homoscedasticity for fixed effects and random effects normally distributed with constant variance. The ANOVA was followed by Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons among experimental and control groups (fixed effects). Data obtained after the evaluation of CV staining assay were evaluated using Wilcoxon's nonparametric tests for pairwise comparisons between control (P-L-) and PDT groups of each species and the Kruskal-Wallis test was used to test the null hypothesis among P-L- groups of the three species. The significance level adopted was 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS\*

### Photodynamic inactivation of planktonic cultures of *Candida*

Table 1 shows the minimal Cur concentration required to achieve at least 4 log decrease in log(CFU/mL) values after PDT. It can be seen from this table that the efficiency of Cur as a fungicidal PS was not homogeneous among the different isolates belonging to the same species. Considering the mean response obtained from the five isolates of each species, the 4 log reduction in *C. albicans* and *C. tropicalis* viability occurred with the use of 10 $\mu$ M of Cur at all light fluences

---

\* Os resultados originais e análises estão apresentados no Apêndice (Item 7.2)

### 3.2 Capítulo 2

tested, while *C. glabrata* required 20 $\mu$ M of Cur associated with light fluencies starting at 18J/cm<sup>2</sup>.

The mixed model nested ANOVA showed that PDT groups presented a significant level of variation within the same species, which suggested a different response of the distinct isolates to photoinactivation. Confidence intervals of 95% showed that the random effect represented by the five *Candida* isolates of each species was the major factor influencing the variability in colony counts within each PDT group. The use of different strains accounted for 98.0; 99.3 and 98.8% of the total variability observed in the PDT groups, for *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* respectively. ANOVA also showed a significant variation of the mean colony counts among the P-L-, P+L-, P-L+, and PDT groups. The results of multiple comparisons are shown in Table 2. All the associations of Cur and LED light were able to promote a significant reduction in *C. albicans* and *C. tropicalis* viability, when compared with the P-L- condition. A significant reduction in *C. glabrata* viability was observed with the use of 10 and 20 $\mu$ M of Cur, at the four LED fluences. Complete inactivation of *C. glabrata* was not observed. On the other hand, the five *C. albicans* isolates were completely killed after PDT mediated by 20 $\mu$ M of Cur, even at the lowest LED fluence. Similarly, *C. tropicalis* isolates were inactivated with 20 $\mu$ M of Cur, but at fluences starting at 18J/cm<sup>2</sup>. Control groups, comprising the P-L-, P+L-, and P-L+ conditions, showed similar values of colony counts.

#### **Photodynamic inactivation of *Candida* biofilms**

Figure 1 shows the effect of PDT mediated by different concentrations of Cur on the metabolic activity of biofilms (absorbance after XTT reduction assay). When compared with the control, PDT induced a significant decrease in absorbance values of all *Candida* species. For *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates, the use of Cur concentrations of 30 and 40 $\mu$ M associated with 5.28J/cm<sup>2</sup>, as well as the use of 20, 30 and 40 $\mu$ M at 18J/cm<sup>2</sup>, promoted a similar reduction in the metabolic activity of biofilms (p<0.05). However, the lowest values of metabolic activity of *C. albicans* biofilms were observed with the use of 40 $\mu$ M of

### 3.2 Capítulo 2

Cur, associated with both 5.28 and 18J/cm<sup>2</sup>. Under these experimental conditions, the percentage of reduction in metabolic activity was over 80% in comparison with the P-L- group (Table 3). Similar results were observed for *C. glabrata* biofilms. For *C. tropicalis*, the association of 40µM with 18J/cm<sup>2</sup> showed the lowest values of metabolic activity of biofilms, reaching 73% of reduction compared to control group (Table 3).

It can be seen from Table 3 that variations in response to PDT were detected in the individual strains of each species. Similar to the results found for the planktonic phase, the mixed ANOVA was able to verify that PDT groups presented a significant level of variation within the same species. Considering the microorganisms in the biofilms phase, the use of different isolates accounted for 85.3; 42.0 and 80.1% of the total variability of XTT values observed in the PDT groups, for *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* respectively.

The quantification of biofilm biomass using the CV assay was performed in P-L- and PDT (40µM at 18J/cm<sup>2</sup>) samples. Biofilm biomass was significantly lower in the PDT samples ( $p < 0.05$ ), suggesting that PDT promoted the partial detachment of biofilms from the wells. The reduction in biomass observed in PDT samples corresponded to 52.3, 69.1 and 64.1% in comparison with the P-L- groups for *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* respectively. In addition, the use of CV staining revealed that the ability to produce biofilms in vitro was higher in *C. albicans* isolates when compared with *C. glabrata* and *C. tropicalis* ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Of the microorganisms regarded as human opportunistic pathogens, members of the genus *Candida* are amongst the most frequently reported. *C. albicans* is still the most prevalent species in health and disease, but other species are emerging as both colonizers and pathogens causing superficial and systemic infections (6). The most common NAC species, *C. glabrata* and *C. tropicalis*, represent a considerable challenge to the development of therapeutic strategies because of their high prevalence in vulnerable groups and resistance to antifungal

### 3.2 *Capítulo 2*

agents (6). Therefore, the development of alternative antifungal therapies becomes mandatory for the control of *Candida* infections. Some previous investigations have already suggested that Cur *per se* may have antifungal properties (29,30) and its combination with light has been proposed in order to improve its antifungal action (23). In view of the promising results, this study investigated the use of different Cur protocols associated with LED light to photosensitize clinical isolates of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*, either in the planktonic and biofilm phase.

The results showed that the use of Cur in association with light was able to promote a significant antifungal effect against the planktonic form of the yeasts. According to Jori et al. (31), the efficiency of a PS can be expressed as the minimal concentration which induces a 4 log decrease in survival of microorganisms. For *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates, the 4 log drop in viable counts was observed with 10 $\mu$ M (3.7mg/L) of Cur at all light fluences tested, while *C. glabrata* isolates required 20 $\mu$ M (7.4mg/L) of Cur with illumination of 18J/cm<sup>2</sup> or higher. In addition, no evidence of colony growth was observed for *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates after photosensitization with 20 $\mu$ M of Cur and illumination at 5.28 and 18J/cm<sup>2</sup> of LED light, respectively. These results are in agreement with those recently published in which a reference strain of *C. albicans* (ATCC 90028) was efficiently killed after Cur-mediated PDT (23). The photodynamic effect of Cur against *Candida* species has not been widely documented in the medical literature, but its antibacterial effect has been described with the use of comparable Cur concentrations (1-25 $\mu$ M) and light fluences (0.5-30J/cm<sup>2</sup>) (26). In the present study, the reduction in viability of the clinical isolates was observed only when Cur was used in conjunction with LED light. In contrast, Garcia-Gomes et al. found that 50 $\mu$ M-Cur, without light excitation, was able to inhibit the growth of one strain of *C. albicans* (32). A recent publication found that the minimum inhibitory concentration (MIC) of Cur against 14 *Candida* strains ranged from 250 to 2000mg/L while fluconazole MICs were between 4 and 64mg/L (33). In comparison with these investigations, the present study used lower Cur concentrations to sensitize the *Candida* isolates in

### 3.2 Capítulo 2

the planktonic form ( $\leq 20\mu\text{M}$  or  $7.4\text{mg/L}$ ). Thus, although promising results were described with the use of Cur without light excitation, higher concentrations of the compound were needed to induce the antifungal effect. Likewise, the studies of Dahl et al. (34) and Tønnesen et al. (35) reported that the antibacterial activity of some Cur concentrations was greatly enhanced by light. Another finding in the present study was that PDT effectiveness was not always fluence-dependent. The use of fluences higher than  $18\text{J/cm}^2$  did not improve the effectiveness of PDT for inactivating the *Candida* species. This could be as a result of the Cur photobleaching which leads to photodegradation of the PS solution and decreases in reactive oxygen species production (23,25).

Since the light fluences of  $5.28$  and  $18\text{J/cm}^2$  showed the best outcomes for *Candida* photoinactivation (planktonic phase), these parameters were selected to be tested against biofilms. When using  $40\mu\text{M}$  of Cur, the metabolic activity of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* biofilms was reduced by 85, 85 and 73% respectively, at  $18\text{J/cm}^2$ . The ability of Cur to act as an antifungal agent against *C. albicans* biofilms has previously been reported (23,36). Accordingly, a similar protocol ( $40\mu\text{M}$  of Cur and  $18\text{J/cm}^2$ ) was used against one ATCC strain of *C. albicans* and the authors observed a decrease of 87% in biofilm viability (23). On the other hand, the photosensitization of *C. glabrata* and *C. tropicalis* biofilms by Cur is a completely new result. It was interesting to note that *C. glabrata* isolates in the planktonic phase seemed to be less susceptible to PDT in comparison with *C. albicans* and *C. tropicalis*, but this observation was not true when biofilms were considered. *C. glabrata* required a higher Cur concentration to achieve 4 log reduction in CFU/mL counts and it was not completely inactivated in any of the protocols tested. Other investigations also found the reduced susceptibility of *C. glabrata* suspensions to photoinactivation (14,15). However, this reduced susceptibility was not observed in *C. glabrata* biofilms, which showed similar levels of photoinactivation in comparison with *C. albicans* biofilms. According to Seneviratne et al. (11), *C. albicans* isolates usually form thicker biofilms with the presence of hyphal elements that support the exopolymeric substances and blastospores, promoting a three-dimensional multilayered community. In contrast,

### 3.2 Capítulo 2

*C. glabrata* isolates are more prone to producing thinner and compact biofilms (11). In the present investigation, a liquid medium was used to grow the biofilms (RPMI-1640) which induces hyphal formation in *C. albicans* cultures (37). Thus, the presence of a robust architecture in *C. albicans* biofilms was probably an important factor influencing the penetration of Cur and light during PDT, differently from the thinner *C. glabrata* biofilms mainly composed of blastospores. For this reason, it is believed that even with the *C. glabrata* cells being more resistant to photoinactivation, the effect against biofilms was equivalent between the two species. In addition, the comparison made among the mean absorbance values (CV staining) found in control biofilms showed that *C. albicans* isolates were strong biofilm-forming strains, when compared with *C. glabrata* and *C. tropicalis* isolates ( $p < 0.05$ ). Conversely, other investigations have found that *C. tropicalis* may have a similar ability to form biofilms when compared with *C. albicans* (38). These different results probably reflect the different growth conditions, i.e. culture medium and substrate, and physiological variations among the strains used in different investigations. The results also showed significant variation in response to PDT among the individual strains of each species. The level of variation within the same species was more pronounced in the planktonic cultures exposed to PDT, but biofilms also showed significant discrepancies. Significant differences observed in the present study among *Candida* species and strains with regard PDT susceptibility also concur with previous studies (15,32,39). Therefore this investigation once again confirms the importance of testing more than one isolate of *Candida* belonging to a given species to characterize the species-specific behavior. In general, significant variation in the response of individual strains was observed, but all of the isolates were susceptible to Cur-mediated PDT.

The Cur-phototoxicity to microbial systems seems to be mediated through the excited states of Cur, their subsequent reactions with oxygen and formation of reactive species (40). The production of non-specific reactive components has important advantages over traditional antifungal treatments. It is unlikely that yeasts could develop resistance to them and microorganisms with innate or

### 3.2 *Capítulo 2*

acquired resistance to antifungal drugs should be susceptible to photodynamic damage. *C. glabrata* is recognized as having a stable resistance to fluconazole, while *C. tropicalis* has shown rapid development of resistance to fluconazole and amphotericin B, especially in cancer patients (6). Our results showed that although *Candida* isolates differed in the response to PDT, the five clinical strains belonging to each species were susceptible to Cur-mediated PDT indicating its broad spectrum of action against *Candida*. According to CV staining assay, Cur-mediated PDT not only reduced the metabolic activity of *Candida* biofilms, but also decreased the biofilm biomass of all species evaluated. It has previously been suggested that PDT can target bacterial biofilms by killing the cells and disrupting biofilm architecture (41). Light micrographs performed by Goulart et al. (42) showed that PDT was able to detach bacterial cells from the well in which biofilms were formed. Thus, it is possible to suggest that Cur mediated PDT can act against *Candida* biofilms in a similar way, simultaneously altering yeast metabolism and causing biofilm disarticulation. It has been suggested that lethal photosensitization is likely to occur in the outermost layers of *C. albicans* biofilms probably due to the superficial penetration of PS into the biofilm layers (43). Since PDT can superficially disrupt the biofilm structure after a single application, it is possible to suppose that repeated cycles of the therapy may be capable of reducing the biofilm biomass, allowing deeper penetration of the PS and promoting higher levels of biofilms inactivation. This mode of action can have important relevance for the design of future clinical investigations on Cur-mediated PDT.

In conclusion, the results from the present investigation showed that low Cur concentrations can be highly effective for inactivating *Candida* isolates when associated with light excitation. The three main *Candida* species that are frequently associated with fungal infections were efficiently photosensitized with the protocols tested. Thus, the parameters established in this in vitro investigation will shortly be used in an animal model of *Candida* infection in order to verify the effectiveness of the therapy for the treatment of oral candidiasis.



### 3.2 *Capítulo 2*

#### REFERENCES

1. Odds FC, eds. *Candida and Candidosis: a Review and Bibliography*. London: Bailliere Tindall. 1988.
2. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, de Oliveira Mima EG, Machado AL, Bagnato VS, Vergani CE. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. *Lasers Med Sci* 2011; in press.
3. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* 1995;74:1152-1161.
4. Samaranayake LP. Host factors and oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, eds. *Oral candidosis*. London: Butterworth, 1990: 66-103.
5. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Cri Rev Oral Biol Med* 1994; 5:125-157.
6. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002; 50:243-260.
7. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20:115-125.
8. Dahiya MC, Redding SW, Dahiya RS, Eng TY, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Sadkowski LC, Fothergill AW, Waite A, Rinaldi MG, Patterson TF, Thomas CR. Oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57:79-83.
9. 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; 93:288-293.
10. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, Rinaldi MG. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:59-64.

### 3.2 *Capítulo 2*

11. 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; 54:1052-1060.
12. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:436-450.
13. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 2008; 163:1-12.
14. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2000-2006.
15. 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; 54:123-130.
16. Paardekooper M, Van den Broek PJ, De Bruijne AW, Elferink JG, Dubbelman TM, Van Steveninck J. Photodynamic treatment of yeast cells with the dye toluidine blue: all-or-none loss of plasma membrane barrier properties. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1108:86-90.
17. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2001; 144: 274-278.
18. Strackhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK and Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology* 2002; 71:345-348.
19. Copley L, van der Watt P, Wirtz KW, Parker MI, Leaner VD. Photolon, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:227-235.
20. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wöhrle D, Dimitrov R, Popova E, Dimitrov S. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10: 91-102.

### 3.2 *Capítulo 2*

21. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 392-401.
22. 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: 1545-1557.
23. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 2011, in press.
24. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem Photobiol* 1994; 59:290-294.
25. Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 295-302.
26. 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: 666-673.
27. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2961-2967.
28. Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3081-3088.
29. Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV, Sabino AA, de Fátima A, de Resende MA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:337-339.
30. Sharma M, Manoharlal R, Puri N, Prasad R. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae

### 3.2 *Capítulo 2*

- development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. *Biosci Rep* 2010; 30:391-404.
31. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 468-481.
  32. Garcia-Gomes AS, Curvelo JA, Soares RM, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. *Med Mycol* 2011, in press.
  33. Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan LA. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Can J Microbiol* 2011; 57:204-210.
  34. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol* 1989; 151: 183-185.
  35. Tønnesen HH, de 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: 371-373.
  36. Kassab NH, Mustafa EA, Al-Saffar MT. The ability of different curcumine solutions on reducing *Candida albicans* biofilm activity on acrylic resin denture base material. *Al-Rafidain Dent J* 2007; 7:32–37.
  37. 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: 5385-5394
  38. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF, Lambrechts SA, Aalders MC, Verbraak FD, Lagerberg JW, Dankert JB and Schuitmaker JJ. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 2008; 8: 442-450.

3.2 *Capítulo 2*

39. Lambrechts SA, Aalders MC, Verbraak FD, Lagerberg JW, Dankert JB, Schuitmaker JJ. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B* 2005;79: 51-57.
40. 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.
41. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol* 2010; 61: 411-416.
42. Goulart R de C, Bolean M, Paulino T de P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: S53-60.
43. Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 2011; 26:341-348.

3.2 *Capítulo 2***TABLES**

Table 1- Minimal Cur concentration ( $\mu\text{M}$ ) required to achieve 4 log decrease in  $\log(\text{CFU/mL})$  values after PDT at different light fluences.

<i>Candida</i> isolate	5.28J/cm <sup>2</sup>	18J/cm <sup>2</sup>	25.5J/cm <sup>2</sup>	37.5J/cm <sup>2</sup>
<b>Ca1</b>	10	10	5	5
<b>Ca2</b>	10	10	10	10
<b>Ca3</b>	20	20	10	10
<b>Ca4</b>	20	10	10	10
<b>Ca5</b>	5	5	5	5
<b>Ca mean*</b>	10	10	10	10
<b>Cg1</b>	20	20	20	20
<b>Cg2</b>	NA	NA	NA	NA
<b>Cg3</b>	20	20	20	20
<b>Cg4</b>	20	20	20	20
<b>Cg5</b>	NA	20	20	20
<b>Cg mean*</b>	NA	20	20	20
<b>Ct1</b>	10	5	5	5
<b>Ct2</b>	NA	10	10	20
<b>Ct3</b>	10	10	10	10
<b>Ct4</b>	10	5	5	5
<b>Ct5</b>	20	10	10	10
<b>Ct mean*</b>	10	10	10	10

\*: Results obtained from the mean of the five clinical isolates.

NA: 4 log drop was not achieved at the light fluence.

Table 2 – Mean values and standard deviation of log(CFU/mL) calculated from the results of the five clinical isolates of each *Candida* species. Different lower case letters denote significant differences among columns (groups) according to Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

Species (mean)	P-L+		P+L-		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup>			PDT 18J/cm <sup>2</sup>			2,5,5J/cm <sup>2</sup>			PDT 37,5J/cm <sup>2</sup>			
	P-L-	P-L+	5μM	10μM	20μM	5μM	10μM	20μM	5μM	10μM	20μM	5μM	10μM	20μM	5μM	10μM	20μM
<i>C. albicans</i>	6.43 <sup>a</sup> 0,17	6.44 <sup>a</sup> 0,17	6.48 <sup>a</sup> 0,09	6.43 <sup>a</sup> 0,15	6.42 <sup>a</sup> 0,12	3.21 <sup>b</sup> 1,14	1.55 <sup>bc</sup> 1,37	0,00	2.98 <sup>bc</sup> 1,23	1.45 <sup>bc</sup> 1,34	0,00	2.56 <sup>bc</sup> 1,52	0.86 <sup>c</sup> 0,86	0,00	2.52 <sup>bc</sup> 1,50	1.05 <sup>bc</sup> 0,93	0,00
<i>C. glabrata</i>	6.55 <sup>a</sup> 0,07	6.53 <sup>a</sup> 0,08	6.58 <sup>a</sup> 0,05	6.55 <sup>a</sup> 0,06	6.56 <sup>a</sup> 0,04	5.19 <sup>ab</sup> 0,46	3.96 <sup>bc</sup> 0,86	2.84 <sup>cde</sup> 0,78	4.86 <sup>ab</sup> 0,59	3.62 <sup>bcd</sup> 0,94	1.85 <sup>de</sup> 1,26	4.90 <sup>ab</sup> 0,58	3.59 <sup>bcd</sup> 0,74	1.83 <sup>de</sup> 1,43	4.97 <sup>ab</sup> 0,56	3.64 <sup>bcd</sup> 0,85	1.79 <sup>e</sup> 1,45
<i>C. tropicalis</i>	5.59 <sup>a</sup> 0,33	5.71 <sup>a</sup> 0,36	5.65 <sup>a</sup> 0,29	5.62 <sup>a</sup> 0,32	5.64 <sup>a</sup> 0,31	2.87 <sup>b</sup> 0,30	0.92 <sup>c</sup> 0,92	0.30 <sup>c</sup> 0,62	1.59 <sup>bc</sup> 0,90	0.27 <sup>c</sup> 0,54	0,00	1.61 <sup>bc</sup> 0,91	0.28 <sup>c</sup> 0,56	0,00	1.62 <sup>bc</sup> 0,92	0.29 <sup>c</sup> 0,58	0,00

3.2 *Capítulo 2*

Table 3 - Percentage of reduction (%) in metabolic activity (XTT reduction assay) obtained after treatment of *Candida* biofilms with PDT. The percentage was calculated versus the XTT value obtained with P-L- group.

<i>Candida</i> isolate	PDT 5.28J/cm <sup>2</sup>			PDT 18J/cm <sup>2</sup>		
	20µM	30µM	40µM	20µM	30µM	40µM
<b>Ca1</b>	67	71	88	65	74	90
<b>Ca2</b>	30	48	70	56	76	87
<b>Ca3</b>	59	72	86	62	75	73
<b>Ca4</b>	69	71	82	73	76	87
<b>Ca5</b>	62	70	81	61	72	84
<b>Ca mean*</b>	57	66	81	63	75	85
<b>Cg1</b>	43	61	80	59	79	81
<b>Cg2</b>	71	71	80	76	86	84
<b>Cg3</b>	43	69	79	64	67	86
<b>Cg4</b>	53	70	83	74	84	90
<b>Cg5</b>	22	67	81	66	76	87
<b>Cg mean*</b>	46	67	81	67	79	85
<b>Ct1</b>	28	55	67	60	73	76
<b>Ct2</b>	33	54	69	47	80	89
<b>Ct3</b>	31	45	47	39	48	57
<b>Ct4</b>	22	39	66	33	53	71
<b>Ct5</b>	36	36	54	53	57	72
<b>Ct mean*</b>	29	46	61	46	62	73

\*: Results obtained from the mean of the five clinical isolates.



## 3.2 Capítulo 2

FIGURE

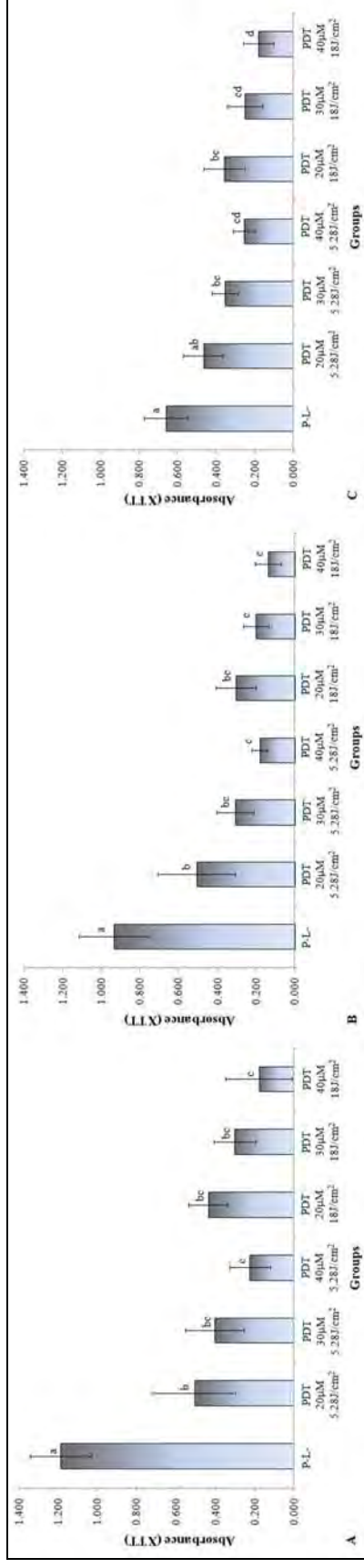


Figure 1- Graphic representation of mean values and standard deviation of absorbance values (XTT assay) observed after experiments with the *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B) and *C. tropicalis* (C) isolates. Different lower case letters denote significant differences among columns (groups) according to Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

## 3.3 *Capítulo 3*

### **Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis\***

Short Title: In vivo photoinactivation of *Candida albicans*

Lívia N. Dovigo, MSc

Ana C. Pavarina<sup>†</sup>, PhD

Juliana C. Carmello, MSc

Carlos A. S. Costa, PhD

Iguatemy L. Brunetti, PhD

Vanderlei S. Bagnato, PhD

Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil,  
14801-903 (LND, ACP, JCC, CASC)

School of Pharmaceutics Sciences, UNESP- Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP,  
Brazil, 14801-902 (ILB)

Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo – USP, São Carlos, SP, Brazil,  
13566-250 (VSB)

**Acknowledgments:** We thank Olympio Teixeira Neto for help with the statistical analysis of data. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, grants FAPESP 2008/03994-9 and 2008/00601-6.

<sup>†</sup> **Corresponding author:** Dr Ana Cláudia Pavarina / e-mail: pavarina@foar.unesp.br

Adress: Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, nº 1680 –  
CEP: 14801–903, Araraquara, SP, Brasil

Phone: #55#016#33016410 / Fax: #55#016#33016406

---

\* Artigo formatado segundo as normas para publicação do periódico **Lasers in Surgery and Medicine**

### 3.3 Capítulo 3

**Key-words:** Oral infection, Photodynamic Therapy, Turmeric

#### **ABSTRACT**

**Background and Objective:** Data obtained from in vitro investigations of curcumin-mediated PDT are encouraging, but the lack of reliable in vivo evidence has not allowed this method to be confirmed as an effective therapy for oral candidiasis. Thus, this study describes the photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidiasis, using curcumin as a photosensitizer. **Study Design/Materials and Methods:** Forty five 6-week-old female Swiss mice were immunosuppressed, provided tetracycline to their drinking water, and then orally inoculated with a suspension of *C. albicans* ( $10^7$  CFU/mL). Five days after oral inoculation, animals belonging to P+L+ groups received a topical administration of curcumin (20, 40 and 80 $\mu$ M) and illumination with LED light at 37.5J/cm<sup>2</sup> (455nm). The use of curcumin or light alone were also evaluated (P+L- and P-L+ groups, respectively). Positive control animals did not receive any treatment (P-L-) and negative control animals were not inoculated with *C. albicans*. After swabbing to recover yeast from the tongue, the number of surviving yeast cells was determined (CFU/mL) and analyzed by ANOVA and Tukey's post-hoc tests ( $\alpha=0.05$ ). Animals were humanely killed, the tongues surgically removed and processed for histological evaluation of presence of yeast and inflammatory reaction. **Results:** All associations of curcumin with LED light were able to significantly reduce *C. albicans* viability after PDT, when compared with the log(CFU/mL) value of P-L- group. The use of 80 $\mu$ M associated with LED light was able to promoted highest log<sub>10</sub> reduction in colony counts (over than 4 logs). The colony counts from P-L-, P+L- and P-L+ groups remained constant. **Conclusion:** Within the limitations of this study, it was concluded that curcumin-mediated PDT proved to be effective for in vivo inactivation of *C. albicans* without harming the host tissue of mice.

### 3.3 *Capítulo 3*

#### **INTRODUCTION**

*Candida* species have been reported as important pathogens in a broad spectrum of human infections, ranging from localized mucocutaneous lesions to serious invasive process (1). Some of the oral candidal infections of clinical significance include the oropharyngeal candidiasis (OPC) and *Candida*-related denture stomatitis (2,3,4). These are opportunistic infections often presented as a chronic recurring condition, which affects mainly immunocompromised individuals and denture wearers. In fact, the OPC is a frequent complication in patients under corticosteroid therapy, immunosuppression after transplantation, or with human immunodeficiency virus infection (3,4,5). Moreover, *Candida* spp. can be involved in disseminated forms of disease, such as nosocomial infections (6,7), and nosocomial bloodstream infections (6,8,9,10). Generally, *Candida albicans* represents the predominant species, but the so-called non-*albicans Candida* species can also act as opportunist pathogens (1,11). Management of oral candidiasis is typically drug based and can involve topical and systemic antifungal agents (12). However, relapse and recurrence are frequent, requiring either repeated courses of drug therapy or long-term administration of antifungal agents such as fluconazole (13). The extensive use of azoles has resulted in global emergence of resistance in *Candida* species and subsequent treatment failures (14,15). In addition, most manifestations of candidiasis are associated with the formation of *Candida* biofilms on surfaces such as oral tissues, prostheses and implanted devices (16). Antifungal resistance is a key characteristic of candidal biofilms, which is mainly associated with the exopolymeric matrix, dominant metabolic processes, and inter organism interactions (17). Due to the difficulties associated with the use of conventional drugs and antifungal resistance, alternative antifungal strategies are being actively sought. One such approach can be the Photodynamic Therapy (PDT).

Photodynamic inactivation of microorganisms is based on the combination of a drug, known as photosensitizer (PS), and the delivery of a visible light of the appropriate wavelength to excite the PS molecule (18). The killing is a result of the phototoxic reactions, in which PS absorbs photons and induces a serial of

### 3.3 Capítulo 3

reactions involving the formation of radicals and reactive oxygen species (ROS). These ROS can react rapidly with non-specific targets, such as cell membranes and proteins leading to microbial destruction (18). For this reason, PDT carries several advantages, for example high target specificity, few undesired side effects, and little likelihood of promoting the development of resistance by microorganisms (19). Different types of PS have been proposed for antifungal PDT, however, complete killing of *Candida* species is not frequently achieved and some of the available PS showed limited effectiveness against *Candida* biofilms and animal models of candidiasis (20,21).

Curcumin is a small-molecular-weight compound that is isolated from the rhizomes of *Curcuma Longa L.* and is one of the components of the commonly used spice turmeric (22). Recent investigations have shown that curcumin can have antifungal activity against *Candida* spp. and also the capability to inhibit fluconazole resistance and to increase the fungicidal effects of amphotericin B in *Candida* isolates (23,24,25). Additionally, the antifungal effects of curcumin may possibly be enhanced by combination with light, especially in the blue spectral region (26). Due to the superficial penetration depth of blue light into tissues (20), curcumin can be suggested as a suitable PS for treatment of localized superficial infections such as oral candidiasis. Low curcumin concentrations have been shown to be highly effective for photoinactivating *C. albicans*, in planktonic and biofilm form (26). It was also suggested that the therapy was more effective in inactivating the yeast cell than a macrophage cell line, suggesting certain specificity of curcumin-mediated PDT (26).

Therefore, the data obtained from in vitro investigations of curcumin-mediated PDT are encouraging. However, the lack of reliable in vivo evidence has not allowed this method to be confirmed as an effective therapy for the control of oral candidiasis. Then, the aim of the present investigation is to contribute to in vivo antimicrobial PDT development reporting the photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidiasis using different curcumin concentrations in association with LED light.

### 3.3 *Capítulo 3*

#### **MATERIALS AND METHODS**

**Photosensitisers and light source:** Natural curcumin was obtained by Sigma Aldrich, USA. A stock solution (800 $\mu$ M) was prepared in Dimethylsulfoxide (DMSO; 10%) and then diluted in saline solution to obtain the concentrations to be tested. The PS concentrations tested were 20, 40 and 80 $\mu$ M, which correspond to 7.4, 14.7 and 29.5mg/L. A handpiece with a blue (~ 455nm) light-emitting diode (LED, LXHL-PR09, Luxeon<sup>®</sup> III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, California, USA) were designed by Instituto de Física de São Carlos (University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil). The output power of light delivered at the end of the handpiece was 89.2mW/cm<sup>2</sup>.

**Microorganisms and culture condition:** A reference strain of *C. albicans* was used (ATCC number 90028; Rockville, Md, USA). This strain was maintained in yeast-peptone-glucose (YEPD) at -70°C and was reactivated by cultivation in Sabouraud Dextrose Agar containing 5 $\mu$ g/mL gentamicin (SDA) at 37°C for 48 hours before each experiment. The yeast was inoculated in 5mL of Tryptic Soy Broth (TSB) and grown aerobically at 37°C for 24 h. Each culture was harvested after centrifugation at 2000rpm for 10 min, washed twice with sterile distilled water and resuspended in sterile saline to a concentration of 10<sup>7</sup> CFU/mL (20).

**Animal preparation and *Candida* inoculation:** The research protocols for using mice and all animal experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Investigations (Araraquara Dental School, UNESP- Univ Estadual Paulista). Forty-five six-week-old female mice were used for all animal experiments. The mice were kept in cages housing 5 animals in a temperature-controlled room (23  $\pm$  2°C) with a 12:12 h light/dark cycle. Standard mouse chow and tap water were given *ad libitum*.

The methodology described by Takakura et al. (27) and Mima et al. (20) was used to induce oral candidosis in mice. The study design is shown in Figure 1. The animals were immunosuppressed with two subcutaneous injections of prednisolone (Depo-Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brazil) at a dose of 100mg/kg body weight 1 day prior to and 3 days after the infection with *Candida*. Tetracycline hydrochloride (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP,

### 3.3 Capítulo 3

Brazil) in drinking water at the concentration of 0.83mg/mL was given to mice beginning 1 day before inoculation. Animals were anesthetized by an intramuscular injection with 50 $\mu$ L of 2mg/mL chlorpromazine chloride (Farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brazil) on each femur. Small cotton pads (Cottonbaby, Higie-Plus Cottonbaby Ind. Com. Ltda., São José, SC, Brazil) were soaked in a *C. albicans* cell suspension ( $10^7$  CFU/mL) and the tongue of the anesthetized mice was swabbed to produce oral infections.

**Experimental and control groups:** Five days after *Candida* inoculation, 40 mice were randomized into 8 groups according to the type of treatment (P+L+20 $\mu$ M, P+L+40 $\mu$ M, P+L+80 $\mu$ M, P+L-20 $\mu$ M, P+L-40 $\mu$ M, P+L-80 $\mu$ M, P-L+, and P-L-). The animals were anesthetized by an intramuscular injection of 100mg/kg body weight ketamine (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Embu-Guaçu, SP, Brazil) and 10mg/kg body weight xylazine (Produtos Veterinários J. A. Ltda., Patrocínio Paulista, SP, Brazil). Each animal was placed in a supine position on a pad in a device fitted with stainless steel wires that were looped around the incisors to hold the mouth opened. With mandible and cheeks retracted, the tongue was gently positioned out of the mouth as far as possible to avoid any injury to the tissue. Animals belonging to P+L+ groups topically received 70 $\mu$ L of PS at the concentrations tested (20, 40 and 80 $\mu$ M) on the dorsum of the tongue and mice were maintained in the dark during 20 min (pre-irradiation time). During this period, the tongue of each animal was kept in the oral cavity and the PS was not swallowed, since the animals were anaesthetized. After this period, tongue was pulled out of the mouth again for illumination. The LED device was placed onto the dorsum of the tongue and illumination was performed at 37.5J/cm<sup>2</sup>, which corresponded to 7 min. The antifungal effect of the PS without light excitation was tested by application of curcumin at the same concentrations (20, 40 and 80 $\mu$ M) for the same period of pre-irradiation time and irradiation but in the absence of light (P+L- groups). The group that received light only was exposed to the same LED fluence mentioned above without previous photosensitization with PS (P-L+). The positive control group did not receive either PS or light (P-L-).

### 3.3 Capítulo 3

A negative control group (NCG) of animals was not immunosuppressed and did not receive *C. albicans* inoculation neither any treatment. Recovery of *C. albicans* from tongues of all mice was done at only one time point (Day 7), immediately after treatment for P+L+, P+L- and P-L+ groups. For all groups of mice, the dorsum of the tongue was swabbed for 1 min with a cotton pad. The end of the cotton pad was then cut off, placed in a tube containing 1mL sterile saline and vortexed for 1 min to resuspend the yeast cells. After that, duplicate 25 $\mu$ L aliquots from the 10-fold serial dilutions were spread over the surface of SDA. All plates were aerobically incubated at 37°C for 48h. After incubation, yeast 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 colony forming unit per milliliter (CFU/mL) was determined and transformed into log<sub>10</sub>. Each experimental and control group consisted of five animals.

**Histopathological study:** On day 8, all mice, from all groups, were sacrificed with a lethal dose of ketamine. Tongues were surgically removed, fixed in 10% formalin fixative solution at pH 7.2 and embedded in paraffin. Five- $\mu$ m thick serial sections were cut, mounted on glass slides and stained with periodic acid-Schiff and hematoxylin (PAS-H) stain for histopathological examination and fungal detection in light microscope (Carl Zeiss 62774, Oberkochen, West Germany). Tissue reaction due to *C. albicans* infection associated or not to the PDT was examined by a pathologist blinded to the all groups of mice. A descriptive analysis of the histological characteristics of the tissue with and without local inflammatory response of varied intensity was performed.

**Statistical analysis:** Descriptive analysis was performed to summarize the results. Data obtained were analyzed by means of a linear model ANOVA followed by Tukey's post-hoc tests for multiple comparisons among experimental and control groups. The significance level adopted was 5% ( $p < 0.05$ ).



### 3.3 Capítulo 3

#### RESULTS\*

After five days of *Candida* inoculation (day 7), macroscopic observations showed typical lesions composed of white patches or pseudomembranes on the tongue of all infected mice. The high yeast colonization was confirmed in P-L- animals, since the mean colony counts in this group were of  $1.89 \times 10^5$  CFU/mL. On the other hand, animals that received neither immunosuppression nor *C. albicans* inoculation (NCG) showed absence of macroscopic signs of infection and no colony growth after sampling.

The distribution of  $\log_{10}$ CFU/mL values obtained is presented in box plot format (Figure 2). Two animals belonging to P+L+ 40 $\mu$ M group and four animals from P+L+ 80 $\mu$ M group showed absence of colony growth on SDA plates after treatment, suggesting the complete inactivation of *C. albicans* in these mice. Table 1 shows the mean  $\log_{10}$  drop in each of the P+L+ groups. The use of 80 $\mu$ M of curcumin associated with LED light was able to promote highest  $\log_{10}$  reduction in colony counts (over than 4 logs). Nevertheless, all associations of curcumin and LED light were able to significantly reduce *C. albicans* viability after PDT, when compared with the  $\log(\text{CFU/mL})$  value of P-L- group (Table 2). In general, the colony counts from P-L-, P+L- and P-L+ groups remained between 4.0 and 6.0  $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ . The differences among the mean values of these groups were considered statistically insignificant (Table 2).

Histological analysis of the tongue of the mice belonging to P-L- group showed the presence of yeast and pseudohyphae limited to the keratinized layer on the dorsum of the tongue, and no evidence of invasion of yeast in deep layers of the epithelium. The subjacent connective tissue exhibited mild inflammatory response mediated by mononuclear cells (Figure 3A). The histological examination of animals from P+L- and P-L+ groups revealed similar characteristics. Mice from negative control group showed no evidence of *C. albicans* on the dorsum of the tongue and the epithelial and connective tissues exhibited normal histological characteristics (Figure 3B). Histological examination of tongue of four animals treated with PDT, at 80 $\mu$ M of curcumin,

---

\* Os resultados originais e análises estão apresentados no Apêndice (Item 7.3)

### 3.3 Capítulo 3

revealed absence of the fungi on the tongue of four animals (Figure 3C). Only one animal from this group was still carrying *C. albicans*, but a discrete number of cells was observed (Figure 3D). Animals belonging to the remaining P+L+ groups showed reduced number of yeast, pseudohyphae and hyphae limited to the keratinized layer on the dorsum of the tongue (Figure 3E,F).

#### DISCUSSION

*C. albicans* is a major opportunistic human pathogen that causes superficial and disseminated forms of infections. The increasing emergence of antifungal resistance amongst *Candida* spp. has resulted in a growing interest in the antimicrobial effects of PDT as a therapy for the localized candidiasis. In this context, different types of PS with distinct physicochemical properties have been proposed. Curcumin is a naturally occurring, intensely yellow pigment that exhibits potential therapeutic applications (22,23,28). Recently, this natural compound has been shown to possess phototoxic potential against *Candida* cells, both in planktonic and biofilm phases (26). However, in vivo application of antimicrobial PDT using curcumin has not yet been established. Thus, the present investigation was design to evaluate the association of curcumin and LED light for photoinactivation of *C. albicans* in a murine model of oral candidiasis.

The results showed that PDT was able to promote antifungal effect against *C. albicans*. The association of 20, 40 and 80 $\mu$ M with light was able to produce significant reduction on *Candida* viable counts, when compared to untreated mice (P-L). Although statistical analyses did not find significant differences between the P+L+ groups using 40 and 80 $\mu$ M of curcumin, the highest concentration was the only able to promote over than 4 logs of reduction in *C. albicans* viable counts. In fact, four of the five animals belonging to this P+L+ group (80 $\mu$ M) showed absence of colony growth after the treatment, indicating that complete inactivation of *C. albicans* may have occurred in these animals. To our knowledge there is no previously published study investigating the in vivo photodynamic effects of curcumin against *C. albicans*. However, previous laboratory studies have shown the lethal photosensitization of microorganism using some curcumin

### 3.3 Capítulo 3

preparations (26,29,30). A recent investigation showed that a lower concentration (20 $\mu$ M) was sufficient to produce complete photoinactivation of *C. albicans* suspensions, when compared to the present study (26). Those authors also found a decrease of 87% in *C. albicans* biofilm metabolism using the same concentration and 18J/cm<sup>2</sup> of light (26). Moreover, the in vitro photodynamic effect of curcumin against bacterial species has been described with the use of lower concentrations (1-25 $\mu$ M) (30). According to Dai et al. (31) two main factors can be responsible for the different outcomes when antimicrobial therapies, including PDT, are compared in in vitro and in vivo studies. One is the host tissue competition for binding the PS, which results in a reduced efficacy of in vivo microbial photoinactivation. Other reasons are the formation of complex biofilm on tissue surfaces where the PS access can be difficult and the decrease on PS concentration in deep sites of tissues (31). Therefore this investigation once again confirms the importance of using animal models that mimic human infections to establish effective parameters of new antimicrobial therapies prior to clinical recommendation. It is also important to mention that the antifungal properties of curcumin *per se* have been reported and the in vitro evaluations suggested that concentrations higher than 80 $\mu$ M (or 29.5mg/L) can be need to produce antifungal effect (23,32,33). A recent publication found that the minimum inhibitory concentration (MIC) of curcumin against 14 *Candida* strains ranged from 250 to 2000mg/L (34). Thus, higher concentrations of the compound are needed to induce the antifungal effect without light excitation.

Over the years, a number of studies have been designed to investigate the effects of antimicrobial PDT, especially in the dental field. The growing evidence from in vivo investigations has resulted in the clinical approval of some PDT systems for treating endodontic infections, periodontitis and dental caries (35). However, there are relatively few studies concerning the topical treatment of oral candidiasis by PDT. Previous in vivo reports on photoinactivation of *C. albicans* using methylene blue (21,36) and porphyrins (20) have been published. Teichert et al. (36) used high concentrations of methylene blue (450 and 500 mg/L) and the overall reduction of *C. albicans* viability was approximately of 3 log<sub>10</sub>. Recently,

### 3.3 Capítulo 3

Martins et al. (21) reported the use of a lower methylene blue concentration (100mg/L), but the number of *C. albicans* recovered from lesions remained similar to untreated animals. The use of porphyrin derivatives to treat oral candidiasis also required high concentrations of PS and only a discrete antifungal effect (1.40 log<sub>10</sub> drop) was reported (20). According to Jori et al. (37), the efficiency of a PS can be expressed as the minimal concentration which induces a 4 log decrease in survival of microorganisms. In the present study, the use of 80µM of curcumin associated with 37.5J/cm<sup>2</sup> of LED light was sufficient to promote a drop of 4.65 log<sub>10</sub> in *C. albicans* viability. Thus, compared to the previous published studies on *Candida* photoinactivation, the findings presented here can clearly contribute for the development of effective protocols of antifungal PDT. In addition, curcumin-mediated PDT can have important advantages over traditional treatments of oral candidiasis. First, illumination was performed during only 7 minutes, indicating that PDT rapidly inactivated *Candida* cells while antifungals can take days to work. Using the same animal model of oral candidiasis, Takakura et al. (27) evaluated systemic treatment with fluconazole (in drinking water during 3 days) and topical application of amphotericin B (during 3 days). No *Candida* organisms were detected in animals treated with fluconazole, while only a reduction of *C. albicans* was obtained after topical treatment. In an experimental model of esophageal candidiasis, administration of itraconazole (oral solution once a day for 3 consecutive days) reduced the number of *Candida* cells from 6 to 4 log (CFU/mL) (38). Chami et al. (39) reported that topical application of nystatin (twice a day for 8 consecutive days), for the treatment of induced oral candidiasis in rats, reduced the mean number of viable counts of *C. albicans* from 3.64 to 2.71 log(CFU/mL). Another advantage of PDT is the broad-spectrum of action. The curcumin-phototoxicity to microbial systems seems to be mediated through the excited states of the PS, and their subsequent reactions with oxygen (40). The formation of non-specific reactive species means that PDT could be the first choice to treat a localized infection while a proper identification of the microorganisms involved is being conducted.

### 3.3 Capítulo 3

The preparation of specimens for histological evaluation was performed six days after *Candida* inoculation. Animals belonging to P-L-, P-L+ and P+L- groups showed substantial number of yeast and pseudohyphae localized in the keratinized layer. No invasion of the epithelium was observed and a mild inflammation was seen in the subjacent connective tissue. This finding is in agreement with those reported by Mima et al. (20) which used similar model of oral candidiasis. In contrast, when Takakura et al. (27) firstly described the murine model of oral candidiasis used in the present investigation, a destruction of several epithelial layers was reported. This was probably because those authors used a clinical isolated strain to produce the candidiasis in the animals which can have increased virulence factors, when compared to the reference strain (ATCC) used in the present study. The histological analysis also revealed that PDT had no adverse effects on the adjacent tissue. Although a low inflammatory response was observed in subjacent connective tissue, this characteristic was also observed in all mice infected with *C. albicans*, regardless the type of treatment received. Only the animals from NCG, which did not received *Candida* inoculation, showed absence of signals of inflammation in the subjacent connective tissue. Therefore, the inflammation verified in PDT specimens may be associated with the *Candida* infection and not be related to the PDT treatment. Similarly, a mild inflammatory response in the subjacent connective tissues of mice infected with *C. albicans*, submitted or not to PDT, was observed in a previous investigation (20). In addition, these results agree with the investigation conducted by Fernandes et al. (45), which demonstrated the effectiveness of PDT as an adjunctive treatment of induced periodontitis without causing any harming effects on tissues. An important observation was that the histological sections from PDT groups treated with 20, 40 and 80 $\mu$ M of curcumin revealed a reduced number of yeasts and hyphae in the keratin layer, compared to untreated animals. In fact, four animals that received 80 $\mu$ M of curcumin and light showed absence of *C. albicans* in the tissue surface. It has previously been suggested that PDT can target bacterial biofilms by killing the cells and disrupting biofilm architecture (46,47). Thus, it possible to suggest that curcumin-mediated PDT can act against *Candida*

### 3.3 Capítulo 3

infections in a similar way, simultaneously killing the yeast and causing biofilm disarticulation, which can explain the lack of *Candida* cells in the histological sections.

Judging by the results obtained in the present study, curcumin represents a potential new PS against *Candida* cells. A single application of PDT was sufficient to produce complete elimination of *C. albicans* from some of the evaluated mice. The most promising results were observed with the use of curcumin at 80 $\mu$ M and illumination with 37.5J/cm<sup>2</sup>. Thus, the protocol established in this investigation should expand further in order to evaluate the safety of repeated applications of the therapy on the treatment of oral candidiasis. In addition, the effectiveness of the therapy must be evaluated in clinical trials with a long term evaluation of the outcome of the treatment.

#### REFERENCES

1. Odds FC, eds. *Candida and Candidosis: a Review and Bibliography*. London: Bailliere Tindall. 1988.
2. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J Prosthodont* 2011; 20: 251-60.
3. Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, Ariyawardana A, D'Amato-Palumbo S, Fischer DJ, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer* 2010;18: 985-992.
4. Thompson GR 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 488-495.
5. Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin Ther* 1998; 20: 40-57.
6. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220: 751-758.
7. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the

### 3.3 Capítulo 3

- European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA 1995; 274: 639-644.
8. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med 1999; 27: 887-892.
  9. Peres-Bota D, Rodriguez-Villalobos H, Dimopoulos G, Melot C, Vincent JL. Potential risk factors for infection with *Candida* spp. in critically ill patients. Clin. Microbiol Infect 2004; 10: 550-555.
  10. Pittet, D, Tarara D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. JAMA 1994; 271: 1598-1601.
  11. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002; 50:243-260.
  12. Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral Candidosis. Wright- Butterworth, London, UK 1990.
  13. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. J Infect Dis 1993; 168:463-466.
  14. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 85: 558-564.
  15. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 382-402.
  16. 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; 93:288-293.
  17. 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; 54:1052-1060.

### 3.3 Capítulo 3

18. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 436-450.
19. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 2008; 163: 1-12.
20. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 392-401.
21. Martins J da S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, Jorge AO. 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: 71-77.
22. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1955-1968.
23. Martins CV, da 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: 337-339.
24. Garcia-Gomes AS, Curvelo JA, Soares RM, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. *Med Mycol* 2011 May 4.
25. Tsao S, Yin M. Enhanced inhibitory effect from interaction of curcumin with amphotericin B or fluconazole against *Candida* species. *Journal of Food and Drug Analysis* 2000; 8: 208-212.
26. 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.
27. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, Abe S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 321-326.



### 3.3 *Capítulo 3*

28. Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glöckner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL, Caplan MJ. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Sci* 2004; 304: 600-602.
29. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol* 1989; 151: 183-185.
30. 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: 666-673.
31. Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Mylonakis E, Hamblin MR. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. *Lasers Surg Med* 2010; 42: 38-44.
32. 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.
33. Jianhua, W, Hai W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. *J Med Coll PLA* 2009; 24: 142–147.
34. Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan LA. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Can J Microbiol* 2011; 57:204-210.
35. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009; 6: 170-188
36. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 155-160.
37. 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: 468-481.

### 3.3 *Capítulo 3*

38. Ishibashi H, Hisajima T, Hu W, Yamaguchi H, Nishiyama Y, Abe S. A murine model of esophageal candidiasis with local characteristic symptoms. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 501-6.
39. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 217-226.
40. 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.
41. 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: 523-530.
42. Ricciatti-Sibbald D, Sibbald RG. Dermatologic vehicles. *Clin Dermatol*. 1989; 7: 11-24
43. Anchordoguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, Crowe LM. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1104: 117-122.
44. Chen D, Song D, Wientjes MG, Au JL. Effect of dimethyl sulfoxide on bladder tissue penetration of intravesical paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 363-369.
45. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 219-28.
46. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol* 2010; 61: 411-416.
47. Goulart R de C, Bolean M, Paulino T de P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: S53-60.

3.3 *Capítulo 3***TABLES**

Table 1- Mean log decrease in  $\log(\text{CFU/mL})$  values after PDT at different curcumin concentrations.

<b>Groups</b>	<b><math>\log_{10}</math> drop</b>
P+L+ 20 $\mu\text{M}$	1.51
P+L+ 40 $\mu\text{M}$	3.57
P+L+ 80 $\mu\text{M}$	4.65

Table 2- Post hoc multiple comparisons among groups P-L-, P+L-, P-L+ and P+L+ groups. The given values are the mean  $\log_{10}(\text{CFU/mL})$ .

<b>Groups</b>	<b>Mean <math>\log_{10}(\text{CFU/ml})</math></b>
P-L-	4.91 <sup>a</sup>
P+L- 20 $\mu\text{M}$	5.53 <sup>a</sup>
P+L- 40 $\mu\text{M}$	4.99 <sup>a</sup>
P+L- 80 $\mu\text{M}$	4.53 <sup>ab</sup>
P-L+	5.45 <sup>a</sup>
P+L+ 20 $\mu\text{M}$	3.40 <sup>b</sup>
P+L+ 40 $\mu\text{M}$	1.34 <sup>c</sup>
P+L+ 80 $\mu\text{M}$	0.26 <sup>c</sup>

Different lower case letters denote significant differences among groups according to Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

## 3.3 Capítulo 3

## FIGURES

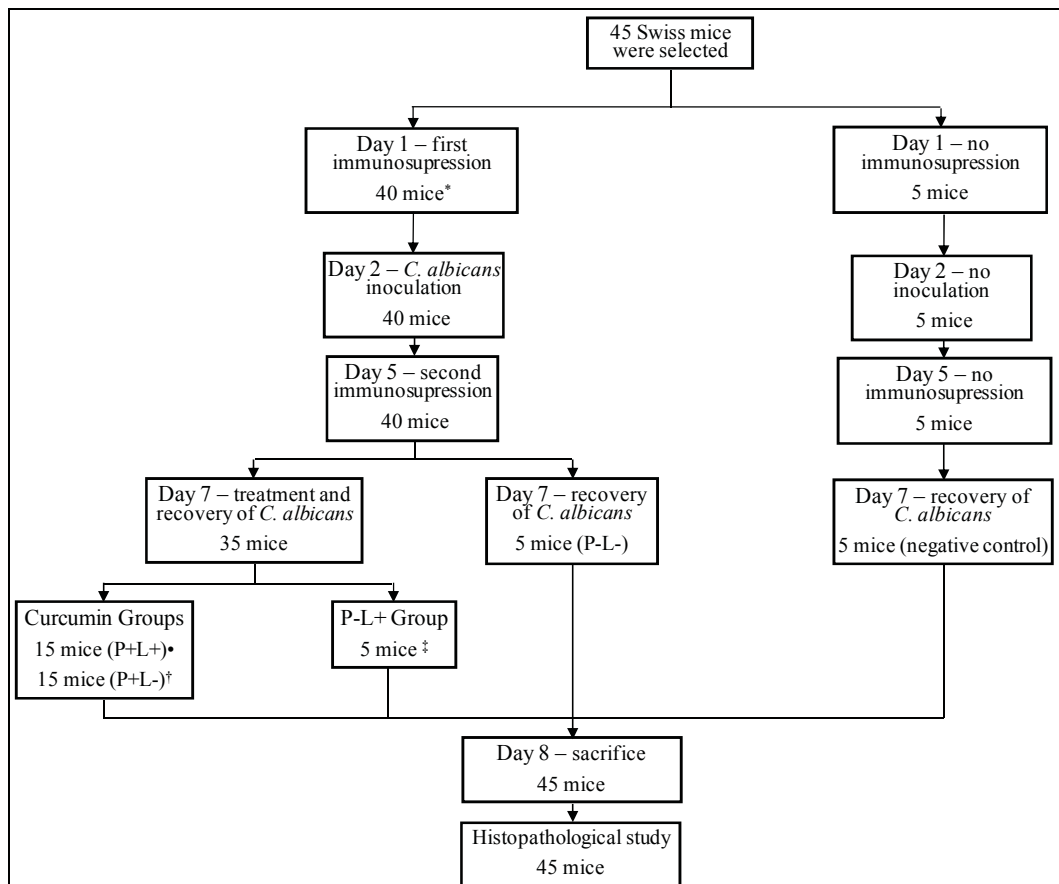


Figure 1- Study design. \*: Tetracycline hydrochloride was given in drinking water during days 1 to 7; •: The P+L+ groups corresponded to the animals treated with PS and LED light; †: The P+L- groups corresponded to evaluation of the three concentrations of PS alone; ‡: The P-L+ group corresponded to evaluation of LED light alone.

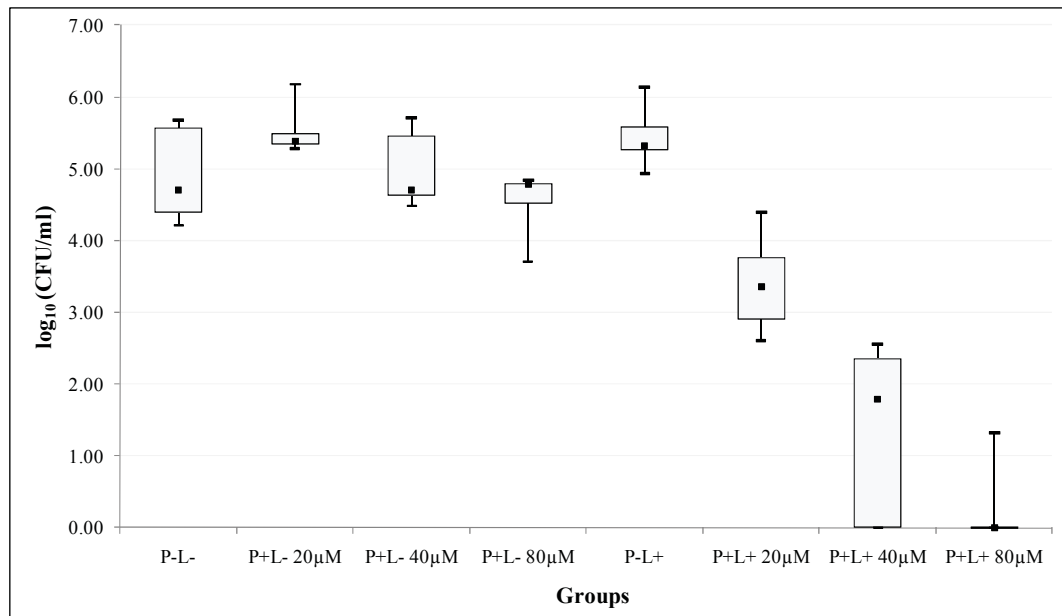
3.3 *Capítulo 3*

Figure 2- Summary of log<sub>10</sub>CFU/mL values obtained in control and experimental groups. The box-plot shows the median (small filled squares), the 1st and 3rd quartiles (outer edges of box), and the minimum and maximum values (error bars).

## 3.3 Capítulo 3

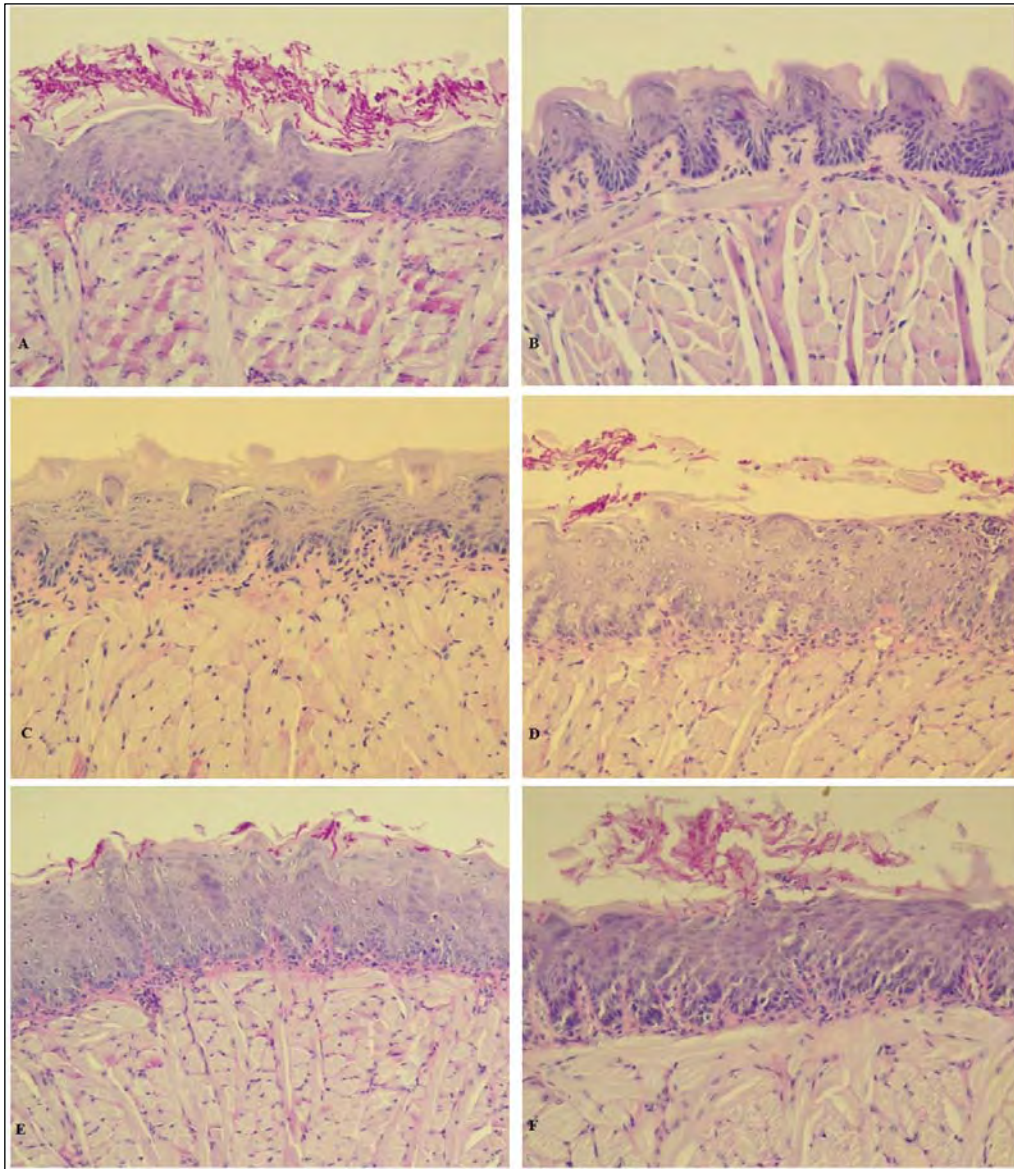


Figure 3- Histological sections of the tongue of mice (PAS-H, X 200). A- Animals that received immunosuppression and *C. albicans* inoculation, but no treatment (P-L- group); B- animals that did not receive immunosuppression, *C. albicans* inoculation and any treatment (NCG); C and D-: Infected animals belonging to P+L+ 80 $\mu$ M group; E- Infected animals belonging to P+L+ 40 $\mu$ M group; F: Infected animals belonging to P+L+ 20 $\mu$ M group.

## *4 Discussão*

---

---

## 4 *Discussão*

O primeiro estudo realizado *in vitro* (Capítulo 1) teve como objetivo avaliar a capacidade da curcumina em fotossensibilizar uma cepa padrão de *C. albicans*, quando associada a uma fonte de luz do tipo LED no comprimento de onda azul (predominantemente em 455nm). A completa inativação do micro-organismo, na forma planctônica, foi observada com a utilização de 20µM de curcumina (ou 7,4mg/L) associada com doses de luz a partir de 5,28J/cm<sup>2</sup> (4 minutos de iluminação). A literatura atual não dispõe de informações sobre a fotoinativação de *C. albicans* mediada pela curcumina, porém alguns estudos já sugeriram que este composto pode possuir efeito antifúngico na ausência de luz<sup>52,55,68,89</sup>. Martins et al.<sup>68</sup> mostraram que a concentração mínima de curcumina que resultou em ausência de colônias viáveis de *C. albicans* foi de 64mg/L. Um método de microdiluição em meio de cultura foi utilizado por Sharma et al.<sup>89</sup> para verificar a susceptibilidade de espécies de *Candida* a curcumina. Os autores relataram que a inibição do crescimento fúngico foi obtida com concentrações de curcumina a partir de 185mg/L quando os micro-organismos estavam em meio líquido, enquanto que maiores concentrações foram necessárias (296-370mg/L) para inibição de crescimento em meio sólido<sup>89</sup>. Outra investigação sugeriu que a divisão celular de *C. albicans* foi aparentemente inibida após exposição à curcumina (1,56 - 12,5g/L), e que esse efeito foi dependente da concentração utilizada<sup>52</sup>.

Os estudos citados sugerem um possível efeito antifúngico da curcumina, mesmo na ausência de iluminação. No entanto, os resultados apresentados no Capítulo 1 mostram que a efetividade da curcumina em reduzir a viabilidade de *C. albicans* foi observada apenas quando este composto foi associado à luz LED. Este resultado pode ser provavelmente justificado pela utilização de baixas concentrações de curcumina, enquanto que a sua utilização sem luz parece exigir maiores concentrações da substância para que o mesmo efeito antifúngico ocorra. Resultados similares foram encontrados por Dahl et



#### 4 Discussão

al.<sup>26</sup>. Os autores descreveram a inativação de *Salmonella typhimurim* utilizando 10 $\mu$ M de curcumina associada à luz, enquanto que esta mesma concentração não ocasionou efeito antimicrobiano na ausência de luz. Tønnesen et al.<sup>100</sup> também sugeriram que o efeito antibacteriano da curcumina é acentuado quando existe iluminação do composto.

O tempo de incubação das células microbianas com o PS, previamente a exposição à fonte de luz, é conhecido como tempo de pré-irradiação (PIT)<sup>51,111,112</sup>. Este parece ser um fator importante para o sucesso da PDT, pois determina a quantidade de PS que se unirá a célula do micro-organismo ou, em alguns casos, que poderá penetrar pela membrana citoplasmática antes que a iluminação seja realizada. Quanto maior a proximidade das moléculas do PS com as células, maior será formação de espécies reativas em local próximo ao alvo desejado, durante a iluminação<sup>51,111</sup>. Jackson et al.<sup>51</sup> descreveram que o PIT influenciou a fotoinativação de *C. albicans* mediada pelo azul de toluidina (TBO). De forma semelhante, Wilson, Mia<sup>111</sup> sugeriram que a sobrevivência de *C. albicans* após PDT, mediada pelo TBO, diminuiu com o aumento do PIT de 1 para 3 minutos. Entretanto, os mesmos autores também verificaram que PITs maiores do que 3 minutos não mostraram influencia na efetividade da PDT<sup>111</sup>. Os resultados do presente estudo mostraram que a incubação das suspensões de *C. albicans* com curcumina por períodos maiores que 5 minutos não resultaram em maior efetividade da terapia quando a iluminação foi realizada com o PS presente na suspensão celular. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Dahl et al.<sup>26</sup>. Contudo, nas amostras em que a curcumina foi removida das suspensões de *Candida* após o PIT (previamente a iluminação), a completa inativação do micro-organismo não foi conseguida, mesmo com a pré-irradiação por 20 minutos. Resultados similares já foram descritos previamente<sup>26</sup>, quando o efeito fotodinâmico sobre culturas de bactérias foi reduzido com a remoção da curcumina previamente a iluminação das amostras. Dessa forma, pode ser sugerido que a fotoinativação de *C. albicans*, mediada pela curcumina, foi influenciada pela presença do PS no meio circundante as células. No entanto, os resultados mostraram que, embora a completa inativação de *C. albicans* não tenha

#### 4 Discussão

ocorrido quando a curcumina foi removida antes da iluminação, redução na viabilidade fúngica foi detectada. Por essa razão, é possível supor que a curcumina possa se ligar e/ou penetrar nas células fúngicas durante o PIT. Na investigação conduzida por Haukvik et al.<sup>46</sup>, imagens obtidas por microscopia de fluorescência confirmaram a presença de curcumina ligada as células de bactérias gram-negativas e positivas. Portanto, os resultados apresentados sugerem uma possível ligação das moléculas de curcumina às células de *C. albicans*, mas este fato não parece ter sido essencial para a fotoinativação do fungo. Avaliações adicionais serão necessárias para se determinar se o PS permanece aderido à membrana citoplasmática ou se existe penetração do composto para o interior das células fúngicas.

O efeito antifúngico da curcumina sobre biofilmes de *C. albicans* foi descrito em apenas um estudo, sem a associação de luz<sup>55</sup>. Na presente investigação, a PDT mediada pela curcumina promoveu reduções significativas no metabolismo dos biofilmes de *C. albicans*. O mesmo protocolo que ocasionou completa inativação das células na forma planctônica (20µM de curcumina; 20 min de PIT; 5,28J/cm<sup>2</sup>), reduziu a atividade metabólica dos biofilmes em 70%, o que foi considerado estatisticamente significativo em comparação às amostras controle. Adicionalmente, a utilização de 40µM de curcumina promoveu redução de 68 e 87% no metabolismo dos biofilmes incubados com curcumina durante 5 e 20 minutos (PIT) respectivamente. Esses resultados parecem sugerir uma possível influência do PIT com curcumina na inativação dos biofilmes, o que poderia ser justificado pelas características estruturais desse tipo de crescimento microbiano<sup>17,24,89</sup>. Os biofilmes consistem em uma comunidade de micro-organismos organizados em camadas de células e envoltos por uma matriz polimérica. Esta estrutura típica é responsável por proteger os micro-organismos no interior dessas comunidades<sup>24</sup>. Alguns PSs parecem possuir limitada capacidade de atuar em biofilmes, o que tem sido atribuído à dificuldade de penetração do composto nas camadas celulares mais profundas<sup>34,75</sup>. No estudo de Pereira et al.<sup>75</sup>, imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura mostraram que a fotossensibilização mediada por azul de metileno ocorreu

#### 4 Discussão

predominantemente nas camadas mais externas dos biofilmes de *C. albicans*. De acordo com os resultados da presente investigação, é possível supor que quanto maior o PIT, maior a penetração da curcumina no interior dos biofilmes, resultando em maiores percentuais de redução metabólica. Por essa razão, Donnelly et al.<sup>32</sup> recomendaram a utilização de maiores períodos de incubação de PS para a avaliação da PDT em biofilmes. Adicionalmente, também já foi sugerido que a PDT sobre biofilmes de *C. albicans* parece exigir a utilização de maiores concentrações de PS, em comparação com a forma planctônica do micro-organismo, de forma a compensar a maior quantidade de células e biomassa existente nos biofilmes<sup>15</sup>.

O efeito antibacteriano da curcumina, quando associada a uma fonte de luz, vem sendo descrito por alguns autores<sup>26,46,100</sup>. A fotoinativação de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus intermedius* e *Escherichia coli* já foi observada com a utilização de 1 a 25µM de curcumina e iluminação com luz azul nas doses de 0,5 a 30J/cm<sup>2</sup><sup>46</sup>. De acordo com as informações disponíveis na literatura, o efeito tóxico da PDT mediada pela curcumina parece ocorrer após a excitação deste composto e a subsequente reação com oxigênio<sup>80,93</sup>. Shen et al.<sup>93</sup> observaram que a diluição da curcumina em DMSO e sua posterior iluminação pode levar a formação do radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Também foi sugerido que uma vez formado o radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>, outras espécies reativas como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), podem ser produzidas e, assim, aumentar a atividade fotossensibilizadora da curcumina<sup>93</sup>. Outra investigação, no entanto, sugeriu apenas o envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fotoinativação de bactérias mediada pela curcumina<sup>26</sup>.

De acordo com a metodologia empregada no Capítulo 1, a possível formação de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foi investigada por meio da adição de azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) previamente a iluminação das amostras de *C. albicans*, tendo em vista que esta substância é um eficiente supressor do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Foi observado que a fotoinativação das suspensões de *C. albicans* não foi negativamente afetada pela presença do supressor, ou seja, pela ausência da formação de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que a presença de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não parece ser essencial para que o efeito fotodinâmico

#### 4 Discussão

ocorra. No estudo de Haukvik et al.<sup>46</sup> os autores examinaram a formação de  $^1\text{O}_2$  em diferentes formulações de curcumina e observaram uma limitada formação dessa espécie reativa de oxigênio. Esses resultados concordam com os de Dahl et al.<sup>26</sup> uma vez que os autores verificaram uma quantidade mínima ou até a ausência da formação de  $^1\text{O}_2$  quando a curcumina se apresentava diluída em solvente prótico. No presente estudo, o solvente aprótico DMSO foi utilizado para dissolver o pó de curcumina, tendo em vista que esse é praticamente insolúvel em água. Em seguida, a solução estoque do PS foi preparada por meio da diluição em solução salina (solução prótica) de forma que a concentração final de DMSO foi de apenas 10%. Portanto, as soluções de curcumina que foram expostas a luz eram constituídas em sua maioria de uma solução aquosa/prótica, o que poderia explicar a baixa formação de  $^1\text{O}_2$ . Entretanto, os resultados da avaliação do PIT sugeriram que a curcumina pode se aderir à membrana celular, a qual é considerada uma estrutura lipofílica semelhante a meios apróticos. Por isso, é possível supor que ocorra a formação de espécies reativas características de ambientes apróticos nas camadas lipofílicas da membrana citoplasmática, e o  $^1\text{O}_2$  poderia se formar no interior da célula, como sugerido por Haukvik et al.<sup>46</sup>. Assim, os resultados do Capítulo 1 sugerem que o efeito fotodinâmico mediado pela curcumina pode não estar necessariamente vinculado à formação de  $^1\text{O}_2$ , porém o mecanismo de fotoinativação fúngica e a produção de outras espécies reativas precisam ser investigados em estudos futuros.

Os resultados apresentados no Capítulo 1 também mostraram que a utilização de doses de luz superiores a  $5,28\text{J}/\text{cm}^2$  não ocasionou maior efetividade da PDT, quando as culturas planctônicas foram avaliadas. Além disso, também foi observado que a capacidade de absorção de luz pela solução de curcumina diminuiu em função do tempo de iluminação (dose de luz) empregado. A avaliação dos espectros de absorbância e fluorescência foi realizada para monitorar, de forma indireta, a fotodegradação da curcumina ( $20\mu\text{M}$ ) e o comportamento fotodinâmico dessa solução. Esse tipo de análise tem sido empregado para comparar a eficiência fotodinâmica de diferentes PSs, bem como correlacionar a fotodegradação das moléculas do PS e a produção de espécies

#### 4 Discussão

reativas de oxigênio (ROS)<sup>14,39</sup>. De acordo com a alta taxa de fotodegradação observada após os maiores períodos de iluminação, pode ser sugerido que, após sua degradação, a solução de curcumina produziu uma reduzida quantidade ROS. Chignell et al.<sup>18</sup> também relataram que a absorbância da curcumina diminuiu após sua iluminação, indicando que a substância foi fotodegradada e que esse processo não produziu fotoprodutos com alta capacidade de absorção de luz. Embora o DMSO não tenha sido utilizado como solvente, os autores sugeriram que a degradação da curcumina durante exposição a uma fonte de luz parece ser um processo que corre independentemente da natureza do solvente utilizado<sup>18</sup>. Por isso, pode ser sugerido que a fotodegradação da curcumina é provavelmente acompanhada pela redução na produção de ROS, já que poucas moléculas opticamente ativas continuam presentes na solução. Este fato poderia justificar os resultados observados após a avaliação de altas doses de luz, tendo em vista que após 4 minutos de iluminação ( $5,28\text{J}/\text{cm}^2$ ) a solução de curcumina já havia sofrido fotodegradação e, portanto, a produção de ROS seria deficiente. Apesar disso, o pico de absorção e fluorescência da curcumina permaneceu constante no mesmo comprimento de onda durante a iluminação. Portanto, se o processo de degradação ocasionou a produção de fotoprodutos, esses não puderam ser detectados na faixa do espectro de luz avaliado neste estudo.

Macrófagos são células imunológicas responsáveis por diversos mecanismos de defesa quando há o desenvolvimento de infecções superficiais como a candidose<sup>104</sup>. Por essa razão, é importante que o possível efeito tóxico da PDT seja avaliado neste tipo celular<sup>7</sup>. Concentrações a partir de  $1\mu\text{M}$  de curcumina associadas à luz promoveram redução significativa no metabolismo celular dos macrófagos, quando comparado às células não tratadas com PDT. O efeito tóxico não ocorreu nas amostras tratadas com curcumina sem iluminação. Um estudo prévio em culturas celulares já sugeriu que a associação de curcumina com luz pode produzir efeitos tóxicos às células de mamíferos<sup>27</sup>. Por outro lado, também existem relatos de que a curcumina atuou seletivamente em células de câncer sem afetar as células normais próximas à lesão<sup>107</sup>. No presente estudo, a PDT não ocasionou a completa inviabilização dos macrófagos, enquanto que o

#### 4 Discussão

mesmo protocolo (20 $\mu$ M; 5,28J/cm<sup>2</sup>) foi efetivo em inativar completamente as suspensões de *C. albicans*. Dessa forma, pode-se supor que as células fúngicas foram mais susceptíveis ao dano fotodinâmico do que os macrófagos. Estudos in vivo poderiam confirmar a relevância clínica desses resultados, já que o efeito da PDT pode ser influenciado pelas condições ambientais no local da infecção, como a presença de outras biomoléculas e interações celulares. Já foi previamente mostrado que a aplicação in vitro da PDT pode ocasionar danos em culturas de fibroblastos<sup>84</sup>, enquanto que o mesmo protocolo não foi capaz de induzir efeitos tóxicos nos tecidos de animais<sup>71</sup>. Assim, os resultados preliminares encontrados neste estudo in vitro ainda precisam ser investigados em estudos que simulem as condições encontradas clinicamente.

Embora a *C. albicans* ainda seja a espécie mais prevalente nas infecções por *Candida*, outras vêm sendo frequentemente isoladas de infecções superficiais e sistêmicas<sup>58</sup>. Entre as espécies não-*albicans* destacam-se a *C. glabrata* e a *C. tropicalis* devido a sua alta prevalência<sup>86</sup> e a frequente resistência aos tratamentos convencionais<sup>58,108</sup>. Por essa razão, novas modalidades terapêuticas para o tratamento das infecções por *Candida* devem, preferencialmente, possuir um amplo espectro de ação atuando efetivamente na inativação de diferentes espécies do mesmo gênero bem como em diferentes cepas da mesma espécie. Tendo em vista os resultados promissores relatados no Capítulo 1, outro estudo foi desenvolvido com o objetivo de se investigar o efeito tóxico da PDT mediada pela curcumina sobre diferentes isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, na forma de suspensões planctônicas e biofilmes.

Os resultados obtidos após a avaliação dos micro-organismos na forma planctônica mostraram que a curcumina em associação com luz promoveu efeito antifúngico para as três espécies avaliadas. Segundo Jori et al.<sup>53</sup> a eficiência de um PS pode ser expressa de acordo com a mínima concentração do agente capaz de induzir uma redução de 4 logs no número de unidades formadoras de colônia (ufc/mL). Para os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*, a redução de 4 logs foi observada com a utilização de 10 $\mu$ M (3,7mg/L) de

#### 4 Discussão

curcumina independentemente da dose de luz aplicada. Para as cepas de *C. glabrata*, foi necessária a utilização de 20 $\mu$ M (7,4mg/L) de curcumina e iluminação com doses de luz a partir de 18J/cm<sup>2</sup>. Adicionalmente, foi verificado que a associação de 20 $\mu$ M de curcumina com 5,28J/cm<sup>2</sup> e 18J/cm<sup>2</sup> de luz ocasionou a ausência de crescimento de colônias para os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. Esse resultado está de acordo com os descritos no Capítulo 1, no qual uma cepa de referência da espécie *C. albicans* foi completamente inativada após a utilização de 20 $\mu$ M de curcumina e luz. Além disso, a utilização de curcumina sem luz não promoveu efeito tóxico em nenhum dos isolados clínicos, de forma similar ao relatado na avaliação da cepa padrão. Isso ocorreu provavelmente devido as baixas concentrações utilizadas para fotossensibilizar as suspensões planctônicas ( $\leq$  20 $\mu$ M ou 7.4mg/L). Estudo recente determinou que a mínima concentração inibitória (MIC) de curcumina sobre 14 isolados clínicos de *Candida* variou entre 250 e 2000mg/L, enquanto que o MIC do fluconazol sobre os mesmo isolados esteve entre 4 e 64mg/L<sup>72</sup>. Dessa forma, os resultados apresentados no presente estudo novamente sugerem que o efeito antifúngico da curcumina pode ser acentuado com a associação de luz, o que leva a utilização de menores concentrações do agente evitando assim a ocorrência de possíveis efeitos tóxicos. Outro resultado observado foi que a efetividade da PDT nem sempre esteve na dependência do aumento na dose de luz utilizada. Considerando as 15 cepas avaliadas, a utilização de doses superiores a 18J/cm<sup>2</sup> não aumentou a efetividade da PDT sobre as células planctônicas. A fotodegradação da solução de curcumina durante a exposição a luz, e conseqüentemente, a diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio, pode explicar esses resultados<sup>18</sup>.

Tendo em vista que as doses de 5,28 e 18J/cm<sup>2</sup> foram efetivas na inativação de *Candida* na forma planctônica, e que doses de luz superiores não promoveram melhores resultados, ambas foram selecionadas para a avaliação em biofilmes. A utilização de 40 $\mu$ M de curcumina associada a 18J/cm<sup>2</sup> promoveu uma redução de 85, 85 e 73% na atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, respectivamente. De forma semelhante, o

#### 4 Discussão

mesmo protocolo (40 $\mu$ M e 18J/cm<sup>2</sup>) foi responsável pela diminuição em 87% do metabolismo de biofilmes formados por uma cepa padrão de *C. albicans* (Capítulo 1). No entanto, a fotosensibilização mediada pela curcumina de biofilmes de *C. glabrata* e *C. tropicalis* é um resultado completamente novo. Foi interessante observar que os isolados de *C. glabrata*, na forma planctônica, mostraram menor suscetibilidade a PDT em comparação aos de *C. albicans* e *C. tropicalis*, já que uma maior concentração de curcumina foi necessária para promover 4 logs de redução nos valores de ufc/mL, e a completa inativação dos isolados não foi observada. Outros estudos já relataram a menor susceptibilidade de células planctônicas de *C. glabrata* aos efeitos fotodinâmicos<sup>10,34</sup>. Porém, este comportamento não se repetiu na avaliação dos biofilmes, pois a resposta da espécie *C. glabrata* foi semelhante àquela observada para *C. albicans*.

Segundo Seneviratne et al.<sup>88</sup> as cepas de *C. albicans* tendem a formar biofilmes espessos com a presença de hifas e pseudo-hifas atuando como suporte para matriz extracelular e blastosporos, o que proporciona uma característica tridimensional e de múltiplas camadas celulares ao biofilme. De forma contrária, os isolados de *C. glabrata* parecem formar biofilmes menos espessos e mais compactos, sem a presença de hifas ou pseudo-hifas<sup>88</sup>. Na presente investigação, foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 para a formação dos biofilmes, o qual é conhecido por induzir a formação de hifas em culturas de *C. albicans*<sup>17</sup>. Portanto, pode ser sugerido que a maior espessura e complexibilidade dos biofilmes formados por *C. albicans* proporcionaram uma maior proteção contra a penetração do PS e da luz durante a PDT, diferentemente dos biofilmes de *C. glabrata*. Então, é provável que mesmo com a maior resistência das células de *C. glabrata* à fotoativação, a resposta dos biofilmes foi similar entre as duas espécies.

Adicionalmente, a comparação realizada entre os valores de absorvância obtidos após a coloração por Cristal Violeta (CV) mostrou que os isolados de *C. albicans* possuíram maior capacidade de formação de biofilme/biomassa, em relação às cepas de *C. glabrata* e *C. tropicalis* (p<0,05). Contrariamente, outros estudos relataram que a *C. tropicalis* parece ter capacidade



#### 4 Discussão

de formação de biofilme semelhante a *C. albicans*<sup>9</sup>. Esses distintos resultados ocorreram provavelmente devido às diferenças nas condições de crescimento adotadas, como por exemplo, o tipo de meio de cultura e substrato, além da diferença existente na fisiologia de diferentes cepas da mesma espécie.

Os resultados também revelaram uma significativa variabilidade na resposta a PDT entre os diferentes isolados da mesma espécie. O nível de variação observado foi mais pronunciado na avaliação das células planctônicas, porém os biofilmes também mostraram diferenças expressivas. Esse comportamento está de acordo com outros estudos que avaliaram a susceptibilidade de diferentes cepas a tratamentos antifúngicos<sup>34,40,61</sup>. Por esse motivo, a presente investigação confirma a importância de se avaliar mais de um isolado pertencente à mesma espécie quando novas terapias antifúngicas estão sendo propostas. O mecanismo de ação da PDT mediada pela curcumina parece estar relacionado à reação de suas moléculas excitadas pela luz com oxigênio, resultando na formação de espécies reativas<sup>80</sup>. Como a toxicidade desses componentes reativos não é específica a um alvo celular, a PDT pode apresentar importantes vantagens em relação aos tratamentos antifúngicos tradicionais, como a improvável ocorrência de resistência microbiana. Além disso, espécies que apresentam resistência antifúngica as drogas tradicionais podem ser eficientemente inativadas por meio do dano fotodinâmico. Estudos relatam que a espécie *C. glabrata* possui resistência intrínseca ao fluconazol, enquanto que um crescente número de isolados de *C. tropicalis* tem mostrado desenvolvimento de resistência ao fluconazol e a anfotericina B<sup>58</sup>. Os resultados apresentados no Capítulo 2 mostraram que, embora uma variação significativa tenha sido observada entre os isolados, todas as cepas avaliadas foram susceptíveis a PDT mediada pela curcumina, independentemente da espécie. Isso indica o amplo espectro de ação que a PDT pode apresentar sobre diferentes espécies de *Candida* e diferentes isolados clínicos.

De acordo com a coloração realizada com CV, a PDT não somente diminuiu o metabolismo celular dos biofilmes, como também reduziu a biomassa aderida nas placas de orifícios. Outras investigações sugeriram que a PDT pode

#### 4 Discussão

atuar sobre biofilmes bacterianos por meio da morte das células e pela ruptura do biofilme<sup>19,45</sup>. Imagens de microscopia realizadas no estudo de Goulart et al.<sup>45</sup> mostraram que a quantidade de células aderidas aos biofilmes microbianos diminuiu após a aplicação da PDT. Por essa razão, é possível sugerir que a PDT mediada pela curcumina possa ter atuado de forma semelhante, alterando o metabolismo celular e desarticulando as estruturas de biofilme, simultaneamente. Isso explicaria a diminuição da biomassa dos biofilmes de *Candida* após a aplicação da PDT. É importante ressaltar ainda que a completa ausência de metabolismo celular não foi observada em nenhuma condição experimental após a PDT, e sim reduções significativas em relação aos biofilmes das amostras controle. Isso ocorreu provavelmente devido a dificuldade da terapia em atingir as camadas mais internas dos biofilmes. Já foi sugerido que a fotossensibilização de biofilmes de *C. albicans* ocorre predominantemente nas camadas celulares mais externas dos biofilmes, em decorrência da penetração superficial do PS<sup>75</sup>. No entanto, como a PDT parece causar uma diminuição na quantidade de células aderidas aos biofilmes, é possível supor que repetidas aplicações da terapia possam potencializar o efeito sobre os biofilmes. Esse efeito poderá ser investigado em estudos futuros.

As observações realizadas nos estudos in vitro mostraram o potencial de aplicação da curcumina para inativação fotodinâmica de espécies de *Candida*. Porém, para que esse método possa ser aplicado clinicamente como modalidade terapêutica no tratamento de candidose bucal, a sua efetividade bem como a possível ocorrência de efeitos adversos nos tecidos tratados deve ser investigada. Considerando os resultados obtidos nos estudos anteriores, uma avaliação in vivo foi conduzida para avaliar a efetividade da PDT na inativação de *C. albicans* presente no tecido lingual de camundongos em um modelo de candidose bucal. Para isso, o modelo animal de candidose proposto por Takakura et al.<sup>97</sup> e posteriormente reproduzido por Mima et al.<sup>71</sup> foi utilizado.

As coletas microbiológicas realizadas imediatamente após a aplicação da PDT mostraram que a utilização da curcumina em associação com iluminação do tipo LED foi efetiva na fotoinativação de *C. albicans* presente nas

#### 4 Discussão

lesões. Três concentrações de curcumina foram avaliadas (20, 40 e 80 $\mu$ M) e todas promoveram redução significativa no número colônias viáveis, em comparação aos valores encontrados nos animais sem tratamento. Apesar da análise estatística não apontar diferenças significantes entre os grupos de PDT tratados com 40 e 80 $\mu$ M de curcumina, apenas a maior concentração produziu redução de 4 logs nos valores de ufc/mL. Na realidade, a ausência de crescimento de colônias foi observada em quatro dos cinco animais pertencentes a esse grupo (80 $\mu$ M), indicando que a completa inativação do fungo provavelmente ocorreu nesses animais.

Apesar de não serem encontrados estudos na literatura que tenham investigado in vivo a PDT mediada pela curcumina em *Candida* spp., os achados das investigações anteriores realizadas in vitro já haviam indicado o potencial da aplicação desta terapia. Além disso, outros estudos laboratoriais publicados previamente sugeriram a possibilidade da fotoinativação de micro-organismos utilizando a curcumina como PS<sup>26,46</sup>. A mesma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) foi utilizada nos experimentos descritos nos Capítulos 1 e 3. Os resultados descritos no primeiro capítulo mostraram que a utilização de 20 $\mu$ M de curcumina associada a 5,28J/cm<sup>2</sup> foi capaz de inativar completamente suspensões planctônicas de *C. albicans*. Por outro lado, no estudo apresentado no Capítulo 3 foi necessária a utilização de maiores concentrações da curcumina para que a PDT resultasse em uma redução satisfatória na viabilidade de *C. albicans*. Segundo Dai et al.<sup>29</sup> alguns fatores podem justificar a diferença entre os resultados observados para uma terapia antimicrobiana avaliada in vitro e in vivo. O primeiro fator que deve ser considerado é a presença do tecido epitelial nas proximidades da infecção, que pode competir com as células microbianas pela ligação com as moléculas do PS reduzindo a eficiência da fotossensibilização. Outros fatores são a formação de biofilme na superfície de tecidos onde o acesso do PS pode ser dificultado e também a diminuição da concentração do PS no interior das camadas teciduais<sup>29</sup>. Portanto, os resultados deste estudo confirmam a importância de se realizar investigações em modelos animais que simulem as condições encontradas clinicamente, a fim de se estabelecer parâmetros efetivos da PDT previamente a

#### 4 Discussão

sua aplicação clínica. Além disso, é importante salientar que a maior concentração utilizada no presente estudo (80 $\mu$ M ou 29,5mg/L) ainda é inferior às concentrações necessárias para que a curcumina produza efeito antifúngico na ausência de luz<sup>52,68,89</sup>.

Nos últimos anos, um considerável número de investigações foi publicado com o intuito de avaliar os efeitos antimicrobianos da PDT, especialmente na área odontológica. O crescente número de evidências científicas proveniente de estudos in vivo resultou na aprovação de alguns sistemas patenteados de PDT para o tratamento de infecções endodônticas, periodontite e cárie dental<sup>28</sup>. Apesar disso, ainda existem pouco relatos na literatura sobre a utilização in vivo da PDT para o tratamento de infecções bucais por espécies de *Candida*. A utilização dos PSs azul de metileno<sup>69,98</sup> e de um derivado de porfirina<sup>71</sup> já foi investigada em estudos realizados em animais. Teichert et al.<sup>98</sup> utilizaram altas concentrações de azul de metileno (450 e 500 mg/L) associadas a iluminação com laser, e a redução na viabilidade de *C. albicans* presente nas infecções foi de aproximadamente 3 logs. Recentemente, Martins et al.<sup>69</sup> utilizaram uma menor concentração do mesmo PS (100mg/L) em outro modelo animal de candidose, com o objetivo de avaliar a virulência de *C. albicans* após a PDT. Foi relatado que após o tratamento, o número de células viáveis de *C. albicans* permaneceu o mesmo encontrado nos animais não tratados. Utilizando o mesmo modelo animal do presente estudo, Mima et al.<sup>71</sup> descreveram a utilização de altas concentrações de um derivado da porfirina (500 e 1000mg/L) para ocasionar apenas 1.40 logs de redução na viabilidade de *C. albicans*. No presente estudo, a associação de 80 $\mu$ M de curcumina com iluminação a 37,5J/cm<sup>2</sup> promoveu uma diminuição de 4,65 logs nas contagens de ufc/mL. Dessa forma, os resultados encontrados podem contribuir para o desenvolvimento de protocolos mais efetivos de fotoinativação in vivo de *Candida*.

Além disso, o tratamento antifúngico baseado na fotossensibilização com curcumina parece possuir importantes vantagens em relação aos medicamentos tradicionais. A iluminação das lesões foi realizada durante apenas 7 minutos, enquanto que a utilização de medicamentos tópicos e sistêmicos pode

#### 4 Discussão

levar vários dias até que uma resposta seja obtida. Takakura et al.<sup>97</sup> utilizaram o mesmo modelo animal de candidose descrito no Capítulo 3 para avaliar o tratamento sistêmico com fluconazol e o tratamento tópico com anfotericina B, ambos administrados durante três dias consecutivos. A aplicação do medicamento sistêmico resultou na ausência de micro-organismos viáveis, enquanto que a aplicação tópica da medicação apenas reduziu o número de *C. albicans* nas infecções<sup>97</sup>. A administração sistêmica de itraconazol (uma vez ao dia durante 3 dias) foi avaliada em um modelo experimental de candidose esofágica, e o número de células de *Candida* foi reduzido de 6 para 4 logs<sup>50</sup>. Chami et al.<sup>16</sup> descreveram a aplicação tópica de nistatina (duas vezes ao dia durante 8 dias) em candidose bucal induzida em ratos e o número de colônias viáveis de *C. albicans* foi reduzido de 3,64 para 2,71 logs (ufc/mL). Assim, os resultados descritos nos estudos citados mostram que além do maior tempo de aplicação dos medicamentos, os tratamentos convencionais parecem promover uma redução na viabilidade fúngica inferior ao obtido com a PDT mediada pela curcumina. Além disso, o mecanismo de ação da fotoinativação de *Candida* tem sido relacionado à produção de espécies reativas não específicas, conferindo um amplo espectro de ação da terapia<sup>80</sup>.

Após 24h da aplicação da PDT, todos os animais foram sacrificados e as línguas foram removidas para posterior análise histológica. As lâminas provenientes dos animais pertencentes aos grupos P-L-, P-L+ e P+L- (controle positivo, aplicação somente de luz, aplicação somente da curcumina) mostraram um elevado número de *C. albicans*, tanto na forma celular (blastosporos) como na forma filamentar (pseudo-hifas e hifas), localizados na camada de queratina. Não foi observada invasão epitelial do micro-organismo, porém o epitélio apresentou-se atrófico, com poucas papilas filiformes. Uma discreta resposta inflamatória foi identificada no tecido conjuntivo subjacente, o qual apresentou predomínio de células mononucleares em meio a uma densa camada de colágeno. Este achado está de acordo com os descritos por Mima et al.<sup>71</sup> que utilizaram um modelo animal semelhante para indução de candidose em camundongos. Porém, quando Takakura et al.<sup>97</sup> descreveram a metodologia de

#### 4 Discussão

indução de candidose utilizada no Capítulo 3, foi relatada a destruição de algumas camadas de epitélio. Isto ocorreu provavelmente porque os autores utilizaram uma cepa de *C. albicans* isolada clinicamente, que pode apresentar maior produção de fatores de virulência<sup>63,96</sup>, enquanto o presente estudo utilizou uma cepa de referência (ATCC).

A comparação das características histológicas encontradas nos grupos tratados com PDT e no grupo P-L- sugere que a terapia aplicada não ocasionou efeitos adversos nos tecidos linguais. Isso porque, independente da aplicação ou não de tratamento, o mesmo nível de resposta inflamatória foi observado no tecido conjuntivo de todos os animais que receberam inoculação por *C. albicans*. Somente os animais pertencentes ao grupo controle negativo, ou seja, que não receberam inoculação de *C. albicans*, não apresentaram sinais de inflamação no tecido conjuntivo. Estes resultados são semelhantes aos observados no estudo conduzido por Mima et al.<sup>71</sup>, no qual os autores verificaram discreta resposta inflamatória nos tecidos subjacentes ao epitélio lingual de todos os animais que receberam inoculação por *C. albicans*, independente de terem sido submetidos à PDT. Por outro lado, Junqueira et al.<sup>54</sup> verificaram poucas alterações epiteliais e menor resposta inflamatória nas línguas dos animais dos grupos tratados com PDT, quando comparados àqueles dos grupos que receberam apenas aplicação de luz. A divergência relacionada à intensidade da reação inflamatória observada nesses estudos pode ser justificada pela utilização de diferentes PSs, tempos de iluminação assim como diferentes metodologias de indução de candidose oral. Ainda, outro estudo mostrou que a aplicação da PDT como método auxiliar no tratamento de periodontite induzida em animais não levou ao aparecimento de efeitos negativos nos tecidos subjacentes a infecção<sup>38</sup>.

Uma importante observação realizada foi que os animais tratados com 40 e 80 $\mu$ M de curcumina e luz mostraram um reduzido número de células de *C. albicans* na superfície do tecido, em comparação com os animais controle. Na realidade, não foi visualizada nenhuma célula de *C. albicans* em quatro dos cinco animais que receberam aplicação de 80 $\mu$ M e luz. Todos os animais desse grupo apresentaram epitélio menos atrófico, com a presença de papilas filiformes e

#### 4 Discussão

camada de queratina com aspecto de normalidade, semelhante às características encontradas nos animais do grupo controle negativo. Os resultados obtidos no Capítulo 2 haviam sugerido que a PDT mediada pela curcumina parece remover as células de *Candida* aderidas em biofilmes. Adicionalmente, o efeito da PDT na desarticulação da arquitetura de biofilmes microbianos também já foi descrito em outras investigações<sup>19,45</sup>. Dessa forma, é possível supor que após a aplicação da PDT mediada pela curcumina, as células de *Candida* não permaneceram aderidas ao tecido lingual dos animais, o que poderia explicar a ausência de células fúngicas nos cortes histológicos observados. Além disso, também pode ser sugerido que após a eliminação do agente etiológico, o tecido epitelial dos animais recuperou os aspectos de normalidade que haviam sido afetados pela infecção fúngica, como a presença de papilas epiteliais, camada basal íntegra e camada de queratina sem invasão microbiana.

Assim, a realização dos três estudos mostrou o potencial da aplicação da curcumina como PS para fotoinativação de *Candida* spp. Uma única aplicação da PDT (80 $\mu$ M e 37,5Jcm<sup>2</sup>) foi suficiente para promover a completa eliminação das células de *C. albicans* em quatro dos cinco animais avaliados. Portanto, os protocolos estabelecidos nesta investigação poderão ser utilizados futuramente para avaliação do efeito de repetidas aplicações da terapia no tratamento de candidose bucal, tanto em animais como em investigações clínicas. Além disso, o efeito de tratamento em longo prazo, bem como a comparação da resposta com antifúngicos tradicionais poderá ser investigada.

## *5 Conclusão*

---

---



## 5 Conclusão

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

1. A associação de 20 $\mu$ M de curcumina com 5,28J/cm<sup>2</sup> de luz promoveu a completa inviabilização de uma cepa de referência de *C. albicans* em suspensões planctônicas.

2. O mesmo protocolo reduziu significativamente o metabolismo de biofilmes formados in vitro com *C. albicans* ATCC, e o metabolismo de uma cultura celular de macrófagos.

3. O efeito fotodinâmico antifúngico foi acentuado pela presença da curcumina no meio circundante durante a iluminação e também pela utilização de maiores PITs.

4. Os espectros de absorção e fluorescência da curcumina, na concentração de 20 $\mu$ M, mostraram uma elevada taxa de fotodegradação da solução após exposição à luz do tipo LED no comprimento de onda azul.

5. A aplicação da PDT mediada pela curcumina promoveu redução significativa na viabilidade de suspensões planctônicas de 15 isolados clínicos das espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

6. A utilização de 40 $\mu$ M de curcumina em associação com 18J/cm<sup>2</sup> reduziu o significativamente o metabolismo e a biomassa dos biofilmes dos isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

7. Todas as combinações avaliadas de curcumina e luz diminuíram significativamente o número de colônias viáveis de *C. albicans* presente em lesões induzidas de candidose bucal.

## 5 Conclusão

8. A aplicação da PDT mediada por 80 $\mu$ M de curcumina e iluminação a 37,5J/cm<sup>2</sup> promoveu a completa eliminação de *C. albicans* das lesões de candidose induzidas em quatro dos cinco animais avaliados.

9. A aplicação isolada da curcumina ou da luz não promoveu efeito antifúngico sobre *C. albicans*, e a utilização da PDT não ocasionou injúrias aos tecidos expostos nos animais testados.

## *6 Referências*

---

---

## 6 Referências\*

1. Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics*. 2005; 116: 61-7.
2. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:40-59.
3. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78: 455-9.
4. Arevalo MP, Arias A, Andreu A, Rodriguez C, Sierra A. Fluconazole, itraconazole and ketoconazole in vitro activity against *Candida* spp. *J Chemother*. 1994; 6: 226-9.
5. Balasubramanian K. Molecular orbital basis for yellow curry spice curcumin's prevention of Alzheimer's disease. *J Agric Food Chem*. 2006; 54:3512-20.
6. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001; 21: 4-8.
7. Benko I, Hernádi F, Megyeri A, Kiss A, Somogyi G, Tegyei Z, et al. Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 43: 675-81.
8. Bergendal T, Isacson G. Effect of nystatin in the treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1980; 88: 446-54.
9. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008; 8: 442-50.

---

\*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)

## 6 Referências

10. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2000-6.
11. Blomgren J, Berggren U, Jontell M. Fluconazole versus nystatin in the treatment of oral candidosis. *Acta Odontol Scand.* 1998; 56: 202-5.
12. 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.
13. Budtz-Jørgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 61-9.
14. Cavalcante R, Imasato H, Bagnato V, Perussi J. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Phys Lett.* 2009; 6: 64–70.
15. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Mitra S, Haidaris CG. Respiratory deficiency enhances the sensitivity of the pathogenic fungus *Candida* to photodynamic treatment. *Photochem Photobiol.* 2008; 84: 1141-8.
16. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8: 217-26.
17. 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.
18. Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994; 59: 295-302.
19. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol.* 2010; 61: 411-6.

## 6 Referências

20. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34: 281-6.
21. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras*. 1996; 42: 229-36.
22. Copley L, van der Watt P, Wirtz KW, Parker MI, Leaner VD. Photolon, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40: 227-35.
23. Costa SF, Marinho I, Araújo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect*. 2000; 45: 69-72.
24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284: 1318-22.
25. Dahiya MC, Redding SW, Dahiya RS, Eng TY, Kirkpatrick WR, Coco BJ, et al. Oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003; 57: 79-83.
26. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*. 1989; 151: 183-5.
27. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem Photobiol*. 1994; 59: 290-4.
28. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009; 6: 170-88.
29. Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Mylonakis E, Hamblin MR. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. *Lasers Surg Med*. 2010; 42: 38-44.
30. de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17: 729-59.

## 6 Referências

31. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26: 377-84.
32. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. 2008; 163: 1-12.
33. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 86: 59-69.
34. 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.
35. Dujic J, Kippenberger S, Ramirez-Bosca A, Diaz-Alperi J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, et al. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int J Cancer*. 2009; 124: 1422-8.
36. 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.
37. Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin Ther*. 1998; 20: 40-57.
38. Fernandes LA, de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Martins TM, et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *J Clin Periodontol*. 2009; 36: 219-28.
39. Ferreira J, Menezes PFC, Sibat CH, Allison RR, Zucoloto S, Silva Jr. OC, et al. Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? *Laser Phys*. 2009; 19: 1932-8.

## 6 Referências

40. Garcia-Gomes AS, Curvelo JA, Soares RM, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. *Med Mycol*. 2011; in press.
41. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011; 20: 251-60.
42. Goldani LZ, Mário PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J Infect*. 2003; 46: 155-60.
43. Goldman GH, Ferreira MES, Marques ER, Savoldi M, Perlin D, Park S, et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50: 25-32.
44. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010; 145: 477-89.
45. Goulart RC, Bolean M, Paulino TP, Thedei Jr G, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28: 53-60.
46. 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.
47. Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoides XLII. *J Pharm*. 2011; 100: 174-85.
48. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992; 55: 145-57.
49. Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 558-64.



## 6 Referências

50. Ishibashi H, Hisajima T, Hu W, Yamaguchi H, Nishiyama Y, Abe S. A murine model of esophageal candidiasis with local characteristic symptoms. *Microbiol Immunol.* 2007; 51: 501-6.
51. 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.
52. Jianhua W, Hai W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. *J Med Coll PLA.* 2009; 24: 142-7.
53. 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.
54. Junqueira JC, Martins JS, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 4: 877-84.
55. Kassab NH, Mustafa EA, Al-Saffar MT. The ability of different curcumine solutions on reducing *Candida albicans* biofilm activity on acrylic resin denture base material. *Al-Rafidain Dent J.* 2007;7: 32-7.
56. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; 50: 97-101.
57. Konsberg R, Axell T. Treatment of *Candida*-infected denture stomatitis with a miconazole lacquer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 306-11.
58. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; 50: 243-60.
59. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72: 283-8.

## 6 Referências

60. Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, Ariyawardana A, D'Amato-Palumbo S, Fischer DJ, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer*. 2010; 18: 985-92.
61. Lambrechts SA, Aalders MC, Verbraak FD, Lagerberg JW, Dankert JB, Schuitmaker JJ. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 79: 51-7.
62. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78 : 189-93.
63. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 632-8.
64. Lyon JP, Resende MA. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. *Mycoses*. 2007; 50: 21-4.
65. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím Nova*. 2000; 32: 237-43.
66. 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.
67. Martinez M, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3135-9.
68. 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.

## 6 Referências

69. 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.
70. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. Med Microbiol. 1995; 42: 372-9.
71. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109: 392-401.
72. Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan LA. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. Can J Microbiol. 2011; 57: 204-10.
73. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DMP, Massucato EMS, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. J Oral Rehabil. 2008; 35: 836-46.
74. Paardekooper M, De Bruijne AW, Van Steveninck J, Van den Broek PJ. Intracellular damage in yeast cells caused by photodynamic treatment with toluidine blue. Photochem Photobiol. 1995; 6: 84-9.
75. Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. Lasers Med Sci. 2010; 26: 341-8.
76. 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.

## 6 Referências

77. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, et al. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 59-64.
78. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 3185-90.
79. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 1994; 220: 751-8.
80. 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.
81. Rajasekaran SA. Therapeutic potential of curcumin in gastrointestinal diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2011; 15: 1-14.
82. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4: 633-8.
83. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98: 53-9.
84. Ribeiro AP, Pavarina AC, Trindade FZ, Inada NM, Bagnato VS, Costa CAS. Photodynamic therapy associating photogem and blue LED on L929 and MDPC-23 cell culture. *Cell Biol Int.* 2010; 34: 343-51.
85. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 668-79.

## 6 Referências

86. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EGO, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111: 726-33.
87. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5: 125-57.
88. 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.
89. 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.
90. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on Staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 299-305.
91. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 1955-68.
92. Shehzad A, Khan S, Shehzad O, Lee YS. Curcumin therapeutic promises and bioavailability in colorectal cancer. *Drugs Today (Barc).* 2010; 46: 523-32.
93. 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.
94. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55: 143-66.

## 6 Referências

95. Strackhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology*. 2002; 71: 345-8.
96. Sweet SP, Cookson S, Challacombe SJ. *Candida albicans* isolates from HIV-infected and AIDS patients exhibit enhanced adherence to epithelial cells. *J Med Microbiol*. 1995; 43: 452-7.
97. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, Abe S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003; 47: 321-6.
98. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93: 155-60.
99. Thompson GR 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109: 488-95.
100. 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.
101. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X, Suffis SD, Su Q, Myers TG, Marr KA, Bennett JE. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 3308-17.
102. Tsao ShyhMing; Yin MeiChin. Enhanced inhibitory effect from interaction of curcumin with amphotericin B or fluconazole against *Candida* species. *J Food Drug Anal*. 2000; 8: 208-12

## 6 Referências

103. Vasconcelos BC, Novaes M, Sandrini FA, Maranhão Filho AW, Coimbra LS. Prevalence of oral mucosa lesions in diabetic patients: a preliminary study. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008; 74: 423-8.
104. Vázquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997; 61: 170-92.
105. Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52: 1040-61.
106. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 13-28.
107. Weng CH, Yung BY, Weng JJ, Wu MH. Involvement of nucleophosmin/B23 in the cellular response to curcumin. *J Nutr Biochem*. 2011; 22: 46-52.
108. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11: 382-402.
109. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011; 55: 250-65.
110. Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998; 185: 380-4.
111. Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitisation of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med Sci*. 1994; 9: 105-9.
112. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitization of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med*. 1995; 16: 272-6.
113. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*. 1995; 20: 115-25.
114. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 2001; 144: 274-8.

## *7 Apêndice*

---

---



## *7 Apêndice - Resultados originais e análises*

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 da absorbância e fluorescência da curcumina em função da dose de luz (ou tempo de exposição à luz)*

As características ópticas da solução de curcumina foram investigadas em função da dose de luz utilizada (ou tempo de iluminação). A solução de curcumina 20 $\mu$ M foi iluminada e a capacidade de absorção de luz e fluorescência da solução foi aferida antes e após a iluminação nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 10, 20 e 29 minutos, que correspondem a 1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20; 26,4 e 37,5J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. O espectro de absorção foi obtido com a utilização do equipamento UV-Visible Spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian). A fluorescência induzida por laser foi mensurada no equipamento desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos - USP com excitação a 405nm acoplado ao equipamento USB4000 (Ocean Optics). Os resultados obtidos após essas análises foram apresentados graficamente nas Figuras A1 e A2.

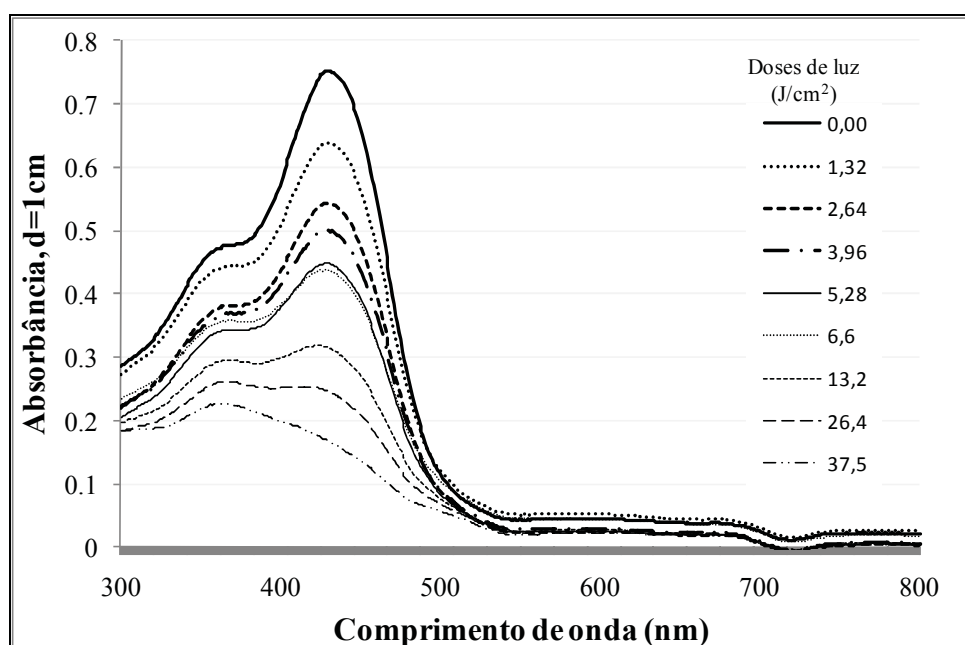


FIGURA A1. Espectro de absorção de luz da curcumina 20 $\mu$ M em função da dose de luz. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011.

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

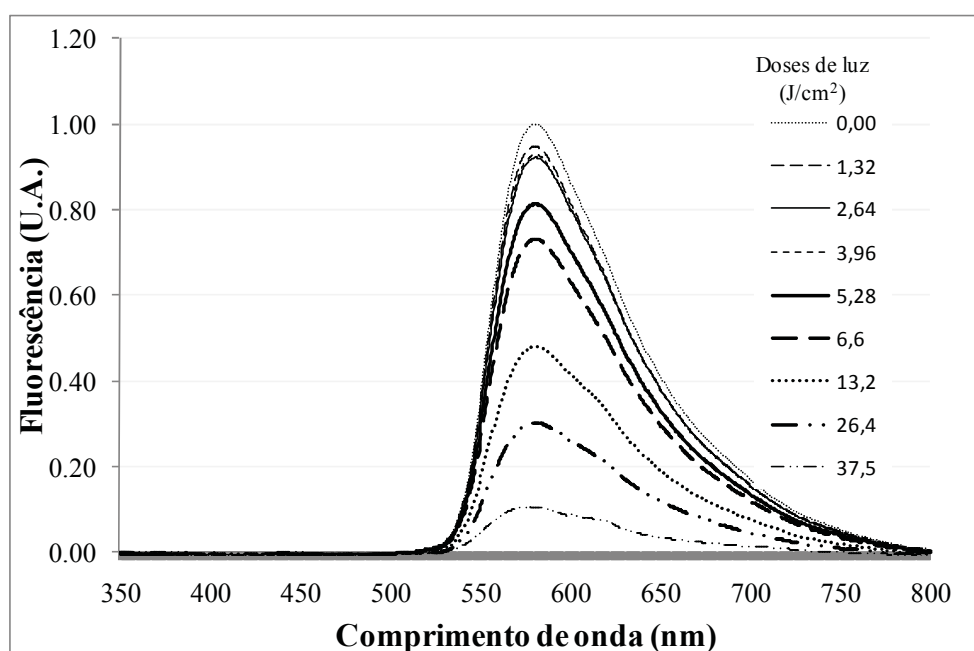


FIGURA A2. Espectro de fluorescência da curcumina 20 $\mu$ M em função da dose de luz. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011.

Todas as curvas de absorção foram integradas, com ajuda do software Microcal Origin 7.5<sup>TM</sup>, e, dessa forma, foram calculadas as áreas de cada perfil de absorção. Os valores da integral normalizada, em relação às doses de luz avaliadas, foram dispostos segundo uma curva de decaimento. Por meio da utilização da fórmula abaixo, foi possível calcular a taxa de fotodegradação da solução de curcumina, a qual foi de -6mM/s ou -0,27M/(J/cm<sup>2</sup>).

$$y(x) = A1 \cdot \exp(-x/t1) + y_0$$

Onde:

y (x) = fotodegradação normalizado

A1 = constante

t1 = taxa de degradação

y<sub>0</sub> = constante

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

### *B- Avaliação de diferentes concentrações de curcumina sobre células planctônicas de C. albicans*

Inicialmente, foram avaliadas nove diferentes concentrações de curcumina (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 $\mu$ M, que correspondem a 0,0018; 0,0037; 0,018, 0,037; 0,18; 0,37; 1,8; 3,7 e 7,4mg/L) em associação com uma dose de luz (37,5J/cm<sup>2</sup>) sobre suspensões planctônicas de *C. albicans* (condições denominadas de P+L+). As mesmas concentrações do PS foram avaliadas sem iluminação para se determinar o possível efeito tóxico da curcumina isoladamente (condições denominadas de P+L-). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem PS nem luz (P-L-). Para cada condição avaliada, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em diferentes ocasiões de experimentos.

Para avaliação da viabilidade celular das amostras, foram obtidas diluições seriadas das amostras (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>), as quais foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar contendo 5  $\mu$ g/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:

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

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 estão apresentados nas Tabelas A1 e A2.

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 A3 e A4.

7.1 *Apêndice Capítulo 1*

Tabela A1- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais P+L+, de acordo com a concentração de curcumina utilizada. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Concentrações de Curcumina (µM)								
0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	20
1,92E+06	1,88E+06	2,74E+06	1,30E+06	1,26E+05	1,82E+04	3,80E+02	2,00E+01	0,00E+00
1,60E+06	2,54E+06	1,78E+06	1,30E+06	2,86E+05	3,50E+04	4,20E+02	6,00E+01	0,00E+00
1,84E+06	1,72E+06	1,66E+06	1,42E+06	1,20E+05	4,16E+04	4,00E+02	4,00E+01	0,00E+00
1,60E+06	1,56E+06	2,06E+06	1,74E+06	1,44E+05	2,82E+04	1,80E+02	2,00E+01	0,00E+00
1,96E+06	1,98E+06	2,42E+06	1,74E+06	1,80E+05	3,96E+04	5,20E+02	2,00E+01	0,00E+00

Tabela A2- Valores originais de ufc/mL obtidos nas condições experimentais P+L-, de acordo com a concentração de curcumina (µM) e na condição P-L-. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

P+L-									
P-L-	0,005 µM	0,01 µM	0,05 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM
2,88E+06	2,48E+06	2,84E+06	1,98E+06	2,90E+06	2,94E+06	2,26E+06	2,68E+06	3,74E+06	2,78E+06
3,32E+06	2,92E+06	2,76E+06	2,68E+06	2,02E+06	2,30E+06	3,10E+06	2,52E+06	2,92E+06	2,60E+06
1,82E+06	2,70E+06	2,96E+06	2,32E+06	2,56E+06	2,66E+06	2,32E+06	2,80E+06	3,32E+06	3,10E+06
2,12E+06	2,82E+06	2,88E+06	2,50E+06	2,32E+06	2,68E+06	2,94E+06	2,62E+06	3,06E+06	3,20E+06
3,16E+06	2,64E+06	3,08E+06	2,44E+06	2,34E+06	2,38E+06	2,64E+06	2,70E+06	2,72E+06	3,18E+06

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A3- Medidas de resumo, em  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$ , calculadas para as amostras das condições experimentais P+L+. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	Concentrações de Curcumina ( $\mu\text{M}$ )								
	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	20
Média	6,25	6,28	6,32	6,17	5,21	4,49	2,56	1,47	0,00
Mediana	6,26	6,27	6,31	6,15	5,16	4,54	2,60	1,32	0,00
Variância	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,03	0,05	0,00
Desvio padrão	0,04	0,08	0,09	0,06	0,15	0,15	0,17	0,22	0,00
Mínimo	6,20	6,19	6,22	6,11	5,08	4,26	2,26	1,32	0,00
Máximo	6,29	6,40	6,44	6,24	5,46	4,62	2,72	1,79	0,00

Tabela A4- Medidas de resumo, em  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$ , calculadas para as amostras das condições experimentais P-L- e P+L-. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-	P+L- (Concentrações de Curcumina em $\mu\text{M}$ )								
		0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	10	20
Média	6,44	6,43	6,46	6,38	6,38	6,41	6,42	6,43	6,50	6,47
Mediana	6,46	6,43	6,46	6,39	6,37	6,42	6,42	6,43	6,49	6,49
Variância	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desvio padrão	0,08	0,03	0,02	0,05	0,06	0,04	0,06	0,02	0,05	0,04
Mínimo	6,33	6,39	6,44	6,30	6,31	6,36	6,35	6,40	6,43	6,41
Máximo	6,52	6,47	6,49	6,43	6,46	6,47	6,49	6,45	6,57	6,51

Como o objetivo principal do estudo foi de verificar qual tratamento resultou em maior efetividade na inativação de *C. albicans*, 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%.

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

O resultado da ANOVA está apresentado nas Tabelas A5 e A6, para comparação entre os grupos P+L+ e P-L-, e P+L- e P-L-, respectivamente. É importante notar que o tratamento de PDT mediado por 20 $\mu$ 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 A5- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos P+L+ e P-L-

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grupos	8	135,52	16,94	1018,37	0,0000
Residuals	36	0,60	0,02		

Tabela A6- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos P+L- e P-L-

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grupos	8	0,05	0,01	2,86	0,0143
Residuals	36	0,08	0,00		

De acordo com as Tabelas A5 e A6, 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 Tabelas A7 e A8.

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A7- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos P-L- e P+L+, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Concentrações de Curcumina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Média de log (ufc/ml)</b>	<b>Teste Tukey*</b>
0 (P-L-)	6,44	a
0,005	6,25	ab
0,01	6,28	ab
0,05	6,32	ab
0,1	6,17	b
0,5	5,21	c
1	4,49	d
5	2,56	e
10	1,47	f

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

Tabela A8- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos P-L- e P+L-, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Concentrações de Curcumina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Média de log (ufc/ml)</b>	<b>Teste Tukey*</b>
0 (P-L-)	6,44	ab
0,005	6,43	ab
0,01	6,46	ab
0,05	6,38	b
0,1	6,38	b
0,5	6,41	ab
1	6,42	ab
5	6,43	ab
10	6,50	a
20	6,47	ab

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



## 7.1 Apêndice Capítulo 1

### *C- Avaliação de diferentes doses de luz associadas a três concentrações de curcumina sobre células planctônicas de C. albicans*

As concentrações de 5, 10 e 20 $\mu$ M foram selecionadas para serem avaliadas em associação com diferentes doses de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20 e 26,4J/cm<sup>2</sup>), por meio da variação do tempo de iluminação das amostras (1, 2, 3, 4, 5, 10 e 20 minutos respectivamente). Para cada condição avaliada, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em diferentes ocasiões de experimentos. A avaliação da viabilidade celular das amostras foi realizada de forma semelhante ao descrito anteriormente (contagem de colônias e cálculo das ufc/mL). Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A9.

Após a transformação dos valores em logaritmo (base 10), 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 A10. Em seguida, 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 inferiores a 0,05, indicando que o conjunto dos dados não atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Considerando a ausência de normalidade e homocedasticidade dos dados, a comparação dos grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual se baseia no estudo posicional dos dados ou postos das observações, ao nível de significância de 5%. Este teste forneceu o p-valor  $3,034 \times 10^{-9}$ , o qual é muito inferior ao nível de significância adotado, indicando haver diferença estatisticamente significativa em pelo menos um dos grupos. Para se detectar onde as diferenças se encontravam, foi necessária a utilização de um teste não paramétrico de comparações múltiplas (post hoc). Os resultados estão apresentados na Tabela A11.



## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A11- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste não paramétrico, ao nível de significância de 5%

<b>Doses de luz (J/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Curcumina (μM)</b>	<b>Posto Médio*</b>
1,32	5	102,80 <sup>a</sup>
	10	87,20 <sup>ab</sup>
	20	50,90 <sup>efg</sup>
2,64	5	83,00 <sup>abc</sup>
	10	67,90 <sup>bcde</sup>
	20	46,10 <sup>fg</sup>
3,96	5	85,70 <sup>abc</sup>
	10	58,30 <sup>def</sup>
	20	25,30 <sup>hi</sup>
5,28	5	77,30 <sup>bcd</sup>
	10	39,70 <sup>fgh</sup>
	20	16,00 <sup>i</sup>
6,6	5	68,70 <sup>bcde</sup>
	10	41,00 <sup>fgh</sup>
	20	16,00 <sup>i</sup>
13,2	5	74,10 <sup>bcd</sup>
	10	33,30 <sup>ghi</sup>
	20	16,00 <sup>i</sup>
26,4	5	66,70 <sup>cde</sup>
	10	41,00 <sup>fgh</sup>
	20	16,00 <sup>i</sup>

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste não paramétrico ( $p > 0,05$ ).

*D- Avaliação dos PITs de 5 e 20 minutos com curcumina, presente ou ausente no meio durante a iluminação, sobre células planctônicas*

A associação de 20μM de curcumina com 5,28J/cm<sup>2</sup> foi selecionada e a influência do PIT foi investigada sob estes parâmetros da PDT. Amostras submetidas a PDT foram incubadas durante 5 ou 20 minutos previamente a iluminação, e a curcumina foi removida ou mantida nas amostras

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

durante a exposição a luz. Para cada condição avaliada, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em diferentes ocasiões de experimentos. Avaliação da viabilidade celular das amostras foi realizada por meio de contagem de colônias e cálculo das ufc/mL. Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A12.

Tabela A12- Valores originais de ufc/mL obtidos após avaliação da PDT, de acordo com o PIT utilizado. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

	PIT	
	5 minutos	20 minutos
Curcumina +	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00	0,00E+00
Curcumina -	1,00E+02	4,00E+01
	2,20E+02	0,00E+00
	1,00E+02	0,00E+00
	1,40E+02	0,00E+00
	1,00E+02	2,00E+01

+: curcumina presente no meio durante iluminação

-: curcumina removida previamente a iluminação

Após a transformação dos valores em logaritmo (base 10), 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 A13. Os resultados foram interpretados segundo a obtenção de inativação total do micro-organismo (ausência de crescimento de colônias) ou inativação parcial. Por isso, apenas a análise descritiva foi necessária para interpretação e discussão dos resultados.

7.1 *Apêndice Capítulo 1*

Tabela A13- Medidas de resumo, em  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$ , calculadas para as amostras das condições submetidas a PDT, de acordo com o PIT e presença de curcumina.

Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	5 minutos PIT		20 minutos PIT	
	Cur +	Cur -	Cur +	Cur -
Média	0,00	2,10	0,00	0,60
Mediana	0,00	2,00	0,00	0,00
Variância	0,00	0,02	0,00	0,66
Desvio padrão	0,00	0,17	0,00	0,79
Mínimo	0,00	2,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	2,34	0,00	1,61

Cur +: curcumina presente no meio durante iluminação

Cur -: curcumina removida previamente a iluminação

*E- Avaliação da participação do  $^1\text{O}_2$  na fotoinativação de *C. albicans**

A possível participação do  $^1\text{O}_2$  durante a fotoinativação de *C. albicans* foi investigada por meio da adição da solução de  $\text{NaN}_3$ , nas concentrações de 100, 50 e 1mM nas amostras. Para isso, os parâmetros de PDT de  $20\mu\text{M}$  de curcumina com  $5,28\text{J/cm}^2$  foram utilizados. Para todas as condições avaliadas, foram realizadas cinco repetições, distribuídas aleatoriamente em diferentes ocasiões de experimentos. Avaliação da viabilidade celular das amostras foi realizada por meio de contagem de colônias e cálculo das ufc/mL. Foi observada ausência de crescimento de colônias nas placas de Petri referentes a todas as amostras avaliadas, independentemente da concentração de  $\text{NaN}_3$  utilizada (Tabela A14). Por essa razão, os resultados foram apresentados apenas de forma descritiva.

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A14- Valores originais de ufc/mL obtidos após avaliação da PDT, de acordo com o com a concentração de  $\text{NaN}_3$  utilizada. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

$\text{NaN}_3$		
100mM	50mM	1mM
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

### *F- Avaliação de diferentes concentrações de curcumina sobre biofilmes de C. albicans*

Foram avaliadas cinco diferentes concentrações de curcumina (5; 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{M}$ , que correspondem a 1,8; 3,7; 7,4; 11,05 e 14,7mg/L) em associação com uma dose de luz (5,28J/cm<sup>2</sup>) sobre biofilmes in vitro de *C. albicans* (P+L+). Além disso, também foram avaliados os PIT de 5 e 20 minutos. A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem PS nem luz (P-L-). 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 A15 e A16.

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 A17 e A18.

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A15- Valores originais de metabolismo celular (XTT) obtidos nos biofilmes formados por *C. albicans* (P-L-), e nos biofilmes fotossensibilizados com diferentes concentrações de curcumina, incubados durante 5 minutos (PIT) e iluminados com 5,28J/cm<sup>2</sup>. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

P-L-	Concentrações de Curcumina				
	5µM	10µM	20µM	30µM	40µM
1,025	0,898	0,439	0,457	0,240	0,326
0,998	0,605	0,505	0,381	0,368	0,254
1,011	0,826	0,556	0,461	0,308	0,297
0,914	0,657	0,527	0,373	0,455	0,392
1,042	0,884	0,506	0,520	0,377	0,357
0,991	0,602	0,514	0,466	0,331	0,353
1,055	0,659	0,418	0,486	0,319	0,227
0,819	0,701	0,586	0,334	0,379	0,214
0,871	0,634	0,636	0,489	0,370	0,324
0,903	0,788	0,488	0,520	0,415	0,319

Tabela A16- Valores originais de metabolismo celular (XTT) obtidos nos biofilmes formados por *C. albicans* (P-L-), e nos biofilmes fotossensibilizados com diferentes concentrações de curcumina, incubados durante 20 minutos (PIT) e iluminados com 5,28J/cm<sup>2</sup>. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

P-L-	Concentrações de Curcumina				
	5µM	10µM	20µM	30µM	40µM
1,025	0,789	0,386	0,247	0,194	0,167
0,998	0,669	0,398	0,272	0,306	0,150
1,011	0,863	0,420	0,397	0,230	0,198
0,914	0,589	0,371	0,282	0,166	0,043
1,042	0,516	0,462	0,320	0,330	0,190
0,991	0,789	0,441	0,356	0,187	0,051
1,055	0,574	0,329	0,195	0,222	0,082
0,819	0,576	0,408	0,163	0,242	0,156
0,871	0,730	0,374	0,324	0,202	0,099
0,903	0,689	0,399	0,284	0,124	0,095

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A17- Medidas de resumo calculadas para os valores de metabolismo celular (XTT) obtidos nos biofilmes formados por *C. albicans* (P-L-), e nos biofilmes fotossensibilizados com diferentes concentrações de curcumina, incubados durante 5 minutos (PIT) e iluminados com 5,28J/cm<sup>2</sup>. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-	Concentrações de Curcumina (µM)				
		5	10	20	30	40
Média	0,963	0,725	0,518	0,449	0,356	0,306
Mediana	0,995	0,680	0,510	0,464	0,369	0,322
Variância	0,006	0,013	0,004	0,004	0,004	0,003
Desvio padrão	0,080	0,114	0,065	0,064	0,060	0,058
Mínimo	0,819	0,602	0,418	0,334	0,240	0,214
Máximo	1,055	0,898	0,636	0,520	0,455	0,392

Tabela A18- Medidas de resumo calculadas para os valores de metabolismo celular (XTT) obtidos nos biofilmes formados por *C. albicans* (P-L-), e nos biofilmes fotossensibilizados com diferentes concentrações de curcumina, incubados durante 20 minutos (PIT) e iluminados com 5,28J/cm<sup>2</sup>. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-	Concentrações de Curcumina (µM)				
		5	10	20	30	40
Média	0,963	0,678	0,399	0,284	0,220	0,123
Mediana	0,995	0,679	0,399	0,283	0,212	0,125
Variância	0,006	0,013	0,001	0,005	0,004	0,003
Desvio padrão	0,080	0,114	0,038	0,071	0,062	0,056
Mínimo	0,819	0,516	0,329	0,163	0,124	0,043
Máximo	1,055	0,863	0,462	0,397	0,330	0,198

Ainda, como uma forma descritiva para representação do efeito da PDT sobre os biofilmes, foi calculada a porcentagem de redução do metabolismo celular (XTT) dos biofilmes. Para isso, o valor médio de absorbância obtido na condição P-L- foi considerando como sendo 100% de metabolismo. Essas porcentagens estão apresentadas na Tabela A19.



## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Tabela A19- Porcentagens de redução no metabolismo celular (XTT) calculados para os biofilmes de *C. albicans* submetidos a PDT, de acordo com a concentração de curcumina e PIT

Condições Experimentais	Porcentagem de redução (%)	
	5 minutos PIT	20 minutos PIT
P+L+ 5 $\mu$ M	24,67	29,55
P+L+ 10 $\mu$ M	46,26	58,58
P+L+ 20 $\mu$ M	53,40	70,51
P+L+ 30 $\mu$ M	63,01	77,12
P+L+ 40 $\mu$ M	68,19	87,22

Como o objetivo principal do estudo foi de verificar qual tratamento resultou em maior redução do metabolismo dos biofilmes de *C. albicans*, 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 ANOVA, ao nível de significância de 5%. Foram realizadas duas análises independentes, uma para comparação dos grupos submetidos ao PIT de 5 minutos e P-L-, e a outra para comparação dos grupos submetidos ao PIT de 20 minutos e P-L-. Os resultados destas análises estão apresentados nas Tabelas A20 e A21.

O valor de probabilidade encontrado em ambas as análises indicou 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 Tabelas A22 e A23.

7.1 *Apêndice Capítulo 1*

Tabela A20- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos P+L+ (5 minutos PIT) e P-L-

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grupos	5	3.095	0.619	106,91	< 0.0001
Residuals	54	0.312	0.006		

Tabela A21- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos P+L+ (20 minutos PIT) e P-L-

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grupos	5	5.049	1.01	184,40	< 0.0001
Residuals	54	0.296	0.005		

Tabela A22- Resultado das comparações múltiplas entre grupos (5 minutos PIT), por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de XTT</b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	0,963	a
P+L+ 5 $\mu$ M	0,725	b
P+L+ 10 $\mu$ M	0,518	c
P+L+ 20 $\mu$ M	0,449	cd
P+L+ 30 $\mu$ M	0,356	de
P+L+ 40 $\mu$ M	0,306	e

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

7.1 *Apêndice Capítulo 1*

Tabela A23- Resultado das comparações múltiplas entre grupos (20 minutos PIT), por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de XTT</b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	0,080	a
P+L+ 5 $\mu$ M	0,114	b
P+L+ 10 $\mu$ M	0,038	c
P+L+ 20 $\mu$ M	0,071	d
P+L+ 30 $\mu$ M	0,062	de
P+L+ 40 $\mu$ M	0,056	e

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

*G- Avaliação da PDT mediada pela curcumina sobre culturas celulares de macrófagos*

A PDT mediada pela curcumina nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 $\mu$ M também foi avaliada sobre culturas celulares de uma linhagem de macrófagos (RAW 264.7). Amostras tratadas com curcumina e posteriormente iluminadas (5.28J/cm<sup>2</sup>) foram denominadas de P+L+. As mesmas concentrações de curcumina também foram avaliadas na ausência de luz (P+L-), assim como a luz na ausência de PS (P-L+). As amostras controle (P-L-) não receberam nem PS nem luz. Em todas as amostras, o metabolismo celular foi determinado pelo ensaio MTT e as leituras de absorvância da reação foram avaliadas em espectrofotômetro com filtro ajustado em 570nm. Uma análise morfológica das células também foi conduzida por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os valores originais de absorvância obtidos com o ensaio MTT estão apresentados na Tabela A24. A análise descritiva dos dados foi realizada por meio do cálculo das medidas de resumo, que estão descritas na Tabela A25.

Tabela A24- Valores originais de absorvância (MTT) observados nas condições experimentais avaliadas sobre culturas celulares de macrófagos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

P-L-	P-L+			P+L+									
	5,28J/cm <sup>2</sup> F	5µM*	10µM*	20µM*	0,005µM*	0,01µM*	0,05µM*	0,1µM*	0,5µM*	1µM*	5µM*	10µM*	20µM*
0,437	0,664	0,396	0,430	0,456	0,572	0,645	0,605	0,430	0,385	0,309	0,099	0,071	0,050
0,404	0,721	0,429	0,476	0,461	0,601	0,657	0,550	0,463	0,471	0,299	0,106	0,166	0,023
0,445	0,718	0,488	0,519	0,492	0,588	0,641	0,583	0,453	0,393	0,372	0,103	0,151	0,031
0,492	0,652	0,498	0,485	0,468	0,567	0,631	0,621	0,473	0,381	0,345	0,119	0,163	0,030
0,488	0,664	0,317	0,402	0,425	0,523	0,504	0,504	0,522	0,487	0,383	0,081	0,105	0,033
0,500	0,692	0,347	0,412	0,462	0,535	0,535	0,594	0,497	0,378	0,348	0,021	0,110	0,102
0,500	0,733	0,367	0,384	0,512	0,635	0,584	0,610	0,559	0,330	0,333	0,037	0,015	0,086
0,382	0,719	0,348	0,384	0,478	0,524	0,567	0,582	0,482	0,410	0,396	0,061	0,148	0,109
0,385	0,709	0,337	0,430	0,498	0,538	0,539	0,591	0,596	0,392	0,395	0,048	0,135	0,040
0,398	0,713	0,413	0,379	0,546	0,542	0,585	0,661	0,621	0,488	0,488	0,100	0,121	0,099

\*: Concentrações de Curcumina

F: Dose de luz

Tabela A25- Medidas de resumo calculadas para os valores de metabolismo celular (MTT) das condições experimentais avaliadas sobre culturas celulares de macrófagos. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de	P-L+			P-L-			P+L+									
	P-L-	5,28J/cm <sup>2</sup> F	5,28J/cm <sup>2</sup> F	5μM*	10μM*	20μM*	0,005μM*	0,01μM*	0,05μM*	0,1μM*	0,5μM*	1μM*	5μM*	10μM*	20μM*	
Resumo																
Média	0,443	0,699	0,711	0,394	0,430	0,480	0,562	0,589	0,590	0,510	0,412	0,367	0,078	0,119	0,060	
Mediana	0,711	0,711	0,711	0,381	0,421	0,473	0,555	0,584	0,592	0,490	0,393	0,360	0,090	0,128	0,045	
Variância	0,002	0,001	0,001	0,004	0,002	0,001	0,001	0,003	0,002	0,004	0,003	0,003	0,001	0,002	0,001	
Desvio padrão	0,049	0,029	0,029	0,063	0,048	0,034	0,037	0,053	0,042	0,064	0,053	0,054	0,033	0,047	0,034	
Mínimo	0,382	0,652	0,652	0,317	0,379	0,425	0,523	0,504	0,504	0,430	0,330	0,299	0,021	0,015	0,023	
Máximo	0,500	0,733	0,733	0,498	0,519	0,546	0,635	0,657	0,661	0,621	0,488	0,488	0,119	0,166	0,109	

\*: Concentrações de Curcumina

F: Dose de luz

## 7.1 Apêndice Capítulo 1

Em seguida, foi verificado se o conjunto de dados atendia aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, ao nível de significância de 5%. Ambos os testes forneceram um p-valor maior que 0,05, indicando que os dados foram normalmente distribuídos, com homogeneidade de variâncias. Assim, o teste estatístico empregado para comparação das médias dos grupos foi a ANOVA, ao nível de significância de 5%. O resultado desta análise está apresentado na Tabela A26.

Tabela A26- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos P+L+, P+L-, P-L+ e P-L-

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grupos	13	5,071	0,39	176,9	< 0.0001
Residuals	126	0,278	0,002		

O valor de probabilidade encontrado indicou 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 Tabelas A27 e A28.

Tabela 27- Resultado das comparações múltiplas entre grupos P-L-, P+L- e P-L+ por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Condições Experimentais	Média de MTT	Teste Tukey*
P-L-	0,443	ab
P-L+	0,699	b
P+L- 5 $\mu$ M	0,394	bc
P+L- 10 $\mu$ M	0,430	ac
P+L- 20 $\mu$ M	0,480	d

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

7.1 *Apêndice Capítulo 1*

Tabela 28- Resultado das comparações múltiplas entre grupos P-L- e P+L+ por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de MTT</b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	0,443	a
P+L+ 0,005 $\mu$ M	0,562	bc
P+L+ 0,01 $\mu$ M	0,589	b
P+L+ 0,05 $\mu$ M	0,590	b
P+L+ 0,1 $\mu$ M	0,510	ac
P+L+ 0,5 $\mu$ M	0,412	ad
P+L+1 $\mu$ M	0,367	d
P+L+5 $\mu$ M	0,078	e
P+L+10 $\mu$ M	0,119	e
P+L+20 $\mu$ M	0,060	e

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p>0,05$ ).

## 7.2 *Capítulo 2*

Inicialmente, foram avaliadas três diferentes concentrações de curcumina (5; 10 e 20 $\mu$ M, que correspondem a 1,8; 3,7 e 7,4mg/L) em associação com quatro doses de luz (5,28; 18; 25,5 e 37,5J/cm<sup>2</sup>) sobre suspensões planctônicas dos micro-organismos (condições denominadas de PDT). As mesmas concentrações do PS foram avaliadas sem iluminação para se determinar o possível efeito tóxico da curcumina isoladamente (P+L-). A aplicação isolada da luz também foi avaliada (P-L+). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem PS nem luz (P-L-). Para cepa avaliada, foram realizadas cinco repetições. Como foram utilizadas 5 cepas de cada espécie, um total de 25 repetições foram realizadas para cada espécie. Para avaliação da viabilidade celular das amostras, foram obtidas diluições seriadas das amostras (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>), as quais foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura 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.

Todas as cepas também foram utilizadas para formação de biofilme *in vitro*. Os biofilmes foram submetidos a PDT por meio da associação de três concentrações de curcumina (20, 30 e 40 $\mu$ M, que correspondem a 7,4; 11,05 e 14,7mg/L) e duas doses de luz (5,28 e 18J/cm<sup>2</sup>). A condição denominada de controle foi constituída de amostras que não receberam nem PS nem luz (P-L-). Para cepa avaliada, foram realizadas cinco repetições. Como foram utilizadas 5 cepas de cada espécie, um total de 25 repetições foram realizadas para cada espécie. Em todas as condições experimentais, o metabolismo celular foi avaliado por meio do ensaio de redução de XTT. O resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro com filtro em 492nm.

Além disso, biofilmes adicionais foram utilizados para a realização de coloração cristal violeta (CV). Nestes casos, apenas a associação de 40 $\mu$ M com 18J/cm<sup>2</sup> foi avaliada, bem como amostras não submetidas a PDT (P-L-). Após os



## 7.2 Apêndice Capítulo 2

procedimentos da coloração, foi realizada leitura em espectrofotômetro com filtro em 595nm.

### *A- Contagem de colônias (ufc/mL)*

#### *A.1- Isolados clínicos de C. albicans*

Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A29.

Os valores de ufc/mL foram transformados em logaritmo (base 10) para a análise pretendida no estudo. Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados, e as principais medidas de resumo calculadas estão apresentadas na Tabela 30. Tendo em vista os objetivos da pesquisa, que eram avaliar qual a associação entre PS e luz mais efetiva para reduzir a viabilidade dos microorganismos, e também avaliar se há efeito dos diferentes isolados na variabilidade dentro de cada grupo, a análise inferencial foi realizada por meio de um modelo ANOVA aninhando, no qual o fator fixo foi representado pelos grupos experimentais, e o fator aleatório foi representado pelos diferentes isolados dentro de cada grupo. Esta análise se baseou na utilização de um modelo linear com erros distribuídos normalmente e variâncias entre grupos apresentando homocedasticidade para o fator fixo, e fatores aleatórios distribuídos normalmente com variância constante. Para a realização da ANOVA, as seguintes hipóteses nulas ( $H_0$ ) foram determinadas:  $H_{01}$ - As médias dos grupos são iguais a uma média global, o que significa que não há grupos com médias estatisticamente diferentes;  $H_{02}$ - Os isolados dentro dos grupos não afetam a variabilidade global dos dados, ou seja, a variância dos efeitos aleatórios é igual à zero. Os grupos que resultaram em médias nulas (valores iguais à zero de ufc/mL) foram removidos da análise. Os resultados desta análise estão na Tabela A31.

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A29- Valores originais de ufc/mL obtidos após avaliação das suspensões planctônicas dos 5 isolados clínicos de *C. albicans* (Ca1 – Ca5), em todas as condições experimentais. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	P-L+		P+L-		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> F			PDT 18J/cm <sup>2</sup> F			PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> F			PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> F			
	37,5J/cm <sup>2</sup> F	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	
Ca1	3,16E+06	3,06E+06	3,32E+06	2,92E+06	2,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	1,80E+02	0,00E+00	0,00E+00	6,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	4,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	
	3,40E+06	4,10E+06	3,06E+06	3,34E+06	6,80E+02	0,00E+00	0,00E+00	1,10E+03	0,00E+00	0,00E+00	2,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	
	4,56E+06	3,51E+06	3,76E+06	4,12E+06	2,89E+06	5,70E+02	0,00E+00	2,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+02	0,00E+00	0,00E+00	7,50E+01	0,00E+00	0,00E+00	
	3,22E+06	4,22E+06	4,17E+06	4,08E+06	3,54E+06	6,10E+02	0,00E+00	1,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	2,60E+01	0,00E+00	0,00E+00	2,11E+02	0,00E+00	0,00E+00	
Ca2	4,16E+06	3,10E+06	4,51E+06	3,55E+06	3,97E+06	5,56E+02	0,00E+00	6,35E+02	0,00E+00	0,00E+00	1,61E+02	0,00E+00	0,00E+00	1,22E+02	0,00E+00	0,00E+00	
	1,38E+06	1,43E+06	3,48E+06	3,52E+06	3,18E+06	3,58E+03	1,00E+02	2,82E+03	6,00E+01	0,00E+00	2,60E+03	2,00E+01	0,00E+00	1,42E+03	3,00E+01	0,00E+00	
	2,00E+06	1,92E+06	2,98E+06	3,18E+06	3,06E+06	4,64E+03	4,00E+01	4,70E+03	2,00E+01	0,00E+00	1,80E+03	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+02	1,40E+01	0,00E+00	
	4,52E+06	4,63E+06	3,55E+06	3,68E+06	3,31E+06	4,18E+03	1,23E+02	4,42E+03	6,60E+01	0,00E+00	4,20E+03	1,40E+01	0,00E+00	1,87E+03	2,70E+01	0,00E+00	
Ca3	2,63E+06	2,57E+06	2,87E+06	3,03E+06	2,96E+06	3,34E+03	4,00E+02	0,00E+00	2,60E+03	3,10E+01	0,00E+00	1,10E+03	4,00E+00	0,00E+00	3,00E+03	1,20E+01	0,00E+00
	2,32E+06	2,32E+06	3,22E+06	3,35E+06	3,13E+06	3,21E+03	3,20E+01	0,00E+00	3,70E+03	5,50E+01	0,00E+00	1,00E+03	6,00E+00	0,00E+00	2,65E+03	1,90E+01	0,00E+00
	1,90E+06	2,10E+06	2,26E+06	1,84E+06	2,06E+06	3,06E+04	1,44E+03	0,00E+00	2,22E+04	1,54E+03	0,00E+00	2,80E+04	8,00E+01	0,00E+00	2,86E+04	4,00E+01	0,00E+00
	2,34E+06	1,94E+06	2,36E+06	1,66E+06	2,40E+06	2,68E+04	1,56E+03	0,00E+00	2,78E+04	1,20E+03	0,00E+00	1,64E+04	1,20E+02	0,00E+00	2,14E+04	3,40E+02	0,00E+00
Ca4	5,54E+06	4,94E+06	3,25E+06	2,24E+06	1,99E+06	3,02E+06	1,94E+03	0,00E+00	3,22E+04	2,24E+03	0,00E+00	1,40E+04	6,50E+01	0,00E+00	2,50E+04	8,10E+01	0,00E+00
	3,26E+06	3,96E+06	3,47E+06	1,06E+06	2,70E+06	3,18E+04	1,36E+03	0,00E+00	1,68E+04	4,20E+03	0,00E+00	2,24E+04	1,03E+02	0,00E+00	1,60E+04	1,24E+02	0,00E+00
	2,80E+06	3,00E+06	2,84E+06	1,70E+06	2,29E+06	2,14E+04	3,16E+03	0,00E+00	3,18E+04	2,21E+03	0,00E+00	3,14E+04	9,20E+01	0,00E+00	1,40E+04	6,50E+01	0,00E+00
	2,98E+06	3,01E+06	2,24E+06	2,20E+06	2,18E+06	1,88E+03	4,80E+02	0,00E+00	2,12E+03	3,20E+02	0,00E+00	2,82E+03	5,00E+01	0,00E+00	1,74E+03	6,00E+01	0,00E+00
Ca5	2,36E+06	2,44E+06	2,32E+06	2,28E+06	1,86E+06	1,60E+03	2,60E+02	0,00E+00	7,80E+02	1,20E+02	0,00E+00	1,40E+03	2,00E+01	0,00E+00	2,04E+03	1,20E+02	0,00E+00
	3,11E+06	2,98E+06	3,24E+06	3,20E+06	1,18E+06	2,38E+03	3,50E+02	0,00E+00	3,12E+03	4,51E+02	0,00E+00	3,12E+03	1,76E+02	0,00E+00	2,14E+03	7,70E+01	0,00E+00
	2,44E+06	2,41E+06	2,12E+06	2,11E+06	3,96E+06	1,20E+03	3,10E+02	0,00E+00	7,80E+03	2,10E+02	0,00E+00	1,10E+03	1,40E+01	0,00E+00	2,04E+02	2,34E+02	0,00E+00
	2,72E+06	2,54E+06	4,12E+06	4,28E+06	4,02E+06	1,77E+03	3,50E+02	0,00E+00	8,10E+02	9,90E+01	0,00E+00	2,98E+02	1,70E+01	0,00E+00	1,53E+03	5,30E+01	0,00E+00
Ca5	2,76E+06	3,11E+06	2,24E+06	2,14E+06	2,18E+06	8,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	1,42E+06	1,39E+06	2,36E+06	2,34E+06	1,98E+06	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	3,16E+06	3,22E+06	3,14E+06	4,44E+06	3,10E+06	7,50E+01	0,00E+00	0,00E+00	1,20E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	1,03E+06	1,00E+06	2,96E+06	1,94E+06	2,22E+06	2,90E+01	0,00E+00	0,00E+00	8,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2,09E+06	3,21E+06	2,68E+06	2,72E+06	2,37E+06	5,50E+01	0,00E+00	0,00E+00	1,40E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A30- Medidas de resumo, em  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$ , calculadas para as amostras de todas as condições experimentais, considerando os resultados provenientes da avaliação de cinco isolados clínicos de *C. albicans* (suspensões planctônicas). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-		P-L+		P+L-		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> F		PDT 18J/cm <sup>2</sup> F		PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> F		PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> F		
	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*
Média	6,48	6,43	6,42	3,21	1,55	0,00	2,98	1,45	0,00	2,56	0,86	0,00	2,52	1,05	0,00
Mediana	6,49	6,48	6,46	3,25	2,00	0,00	3,33	1,75	0,00	3,04	0,85	0,00	3,15	1,30	0,00
Variância	0,01	0,02	0,02	1,29	1,88	0,00	1,52	1,79	0,00	2,32	0,74	0,00	2,26	0,87	0,00
Desvio padrão	0,17	0,15	0,12	1,14	1,37	0,00	1,23	1,34	0,00	1,52	0,86	0,00	1,50	0,93	0,00
Mínimo	6,01	6,03	6,07	1,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	6,74	6,65	6,60	6,48	3,50	0,00	4,51	3,62	0,00	4,50	2,25	0,00	4,46	2,53	0,00

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

Tabela A31- Sumário da ANOVA empregada para o modelo linear aninhado

	gl	Numer.	gl	Denom.	Estatística F	P-valor
(Intercept)	1		260,00		815,81	0,00
Grupo	12		52,00		24,78	0,00
$\hat{\sigma}_e$ :					0,1516	
$\hat{\sigma}_{\text{gr}}^2$ :					1,047401	

$\sigma_e$ : variância dos grupos

$\sigma_{\text{gr}}^2$ : variância dos efeitos aleatórios

7.2 *Apêndice Capítulo 2*

Os resultados indicaram que a  $H_01$  foi rejeitada com p-valor inferior a 0,0001. Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas para se determinar onde se localizavam as diferenças entre os grupos estudados. O resumo desta análise está na Tabela A32.

Tabela A32- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de <math>\log_{10}</math></b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	6,43	a
P-L+ 35,5J/cm <sup>2</sup>	6,44	a
P+L- 5μM	6,48	a
P+L- 10μM	6,43	a
P+L- 20μM	6,42	a
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	3,21	b
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	1,55	bc
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	2,98	bc
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	1,45	bc
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-
PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	2,56	bc
PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	0,86	c
PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-
PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	2,52	bc
PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	1,05	bc
PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

-: grupo não avaliado

Para a decisão sobre a  $H_02$ , foi determinado o intervalo de confiança (IC 95%) da variância dos efeitos aleatórios ( $\sigma_{ea}$ ), pois se o valor zero estivesse incluído no intervalo, a  $H_02$  deveria ser aceita. O IC 95% calculado foi de  $0,8601676 < \sigma_{ea} < 1,275388$ , e, portanto, o valor zero não estava incluído no intervalo, o que levou a rejeição da  $H_02$ . Além disso, foi determinado que 98% da variabilidade observada dentro dos grupos pôde ser explicada pela utilização de diferentes cepas [ $\sigma_{ea}^2 / (\sigma^2 + \sigma_{ea}^2)$ ].

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

### A.2- Isolados clínicos de *C. glabrata*

Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A33.

Os valores de ufc/mL foram transformados em logaritmo (base 10) para a análise pretendida no estudo. Inicialmente, procedeu-se com a análise descritiva dos dados, que está apresentada na Tabela A34. Conforme descrito para a espécie *C. albicans*, a análise inferencial foi realizada por meio de um modelo ANOVA aninhando, no qual o fator fixo foi representado pelos grupos experimentais, e o fator aleatório foi representado pelos diferentes isolados dentro de cada grupo. Esta análise se baseou na utilização de um modelo linear com erros distribuídos normalmente e variâncias entre grupos apresentando homocedasticidade para o fator fixo, e fatores aleatórios distribuídos normalmente com variância constante. Para a realização da ANOVA, as seguintes hipóteses nulas ( $H_0$ ) foram determinadas:  $H_{01}$ - As médias dos grupos são iguais a uma média global, o que significa que não há grupos com médias estatisticamente diferentes;  $H_{02}$ - Os isolados dentro dos grupos não afetam a variabilidade global dos dados, ou seja, a variância dos efeitos aleatórios é igual à zero. Os resultados desta análise estão na Tabela A35.

Os resultados indicaram que a  $H_{01}$  foi rejeitada com p-valor inferior a 0,0001. Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas para se determinar onde se localizavam as diferenças entre os grupos estudados. O resumo desta análise está na Tabela A36. Para a decisão sobre a  $H_{02}$ , foi determinado o intervalo de confiança (IC 95%) da variância dos efeitos aleatórios ( $\sigma_{ea}$ ), pois se o valor zero estivesse incluído no intervalo, a  $H_{02}$  deveria ser aceita. O IC 95% calculado foi de  $0,6779487 < \sigma_{ea} < 0,9602301$ , e, portanto, o valor zero não estava incluído no intervalo, o que levou a rejeição da  $H_{02}$ . Além disso, foi determinado que 99,3% da variabilidade observada dentro dos grupos pôde ser explicada pela utilização de diferentes cepas [ $\sigma_{ea}^2 / (\sigma^2 + \sigma_{ea}^2)$ ].

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A33- Valores originais de ufc/mL obtidos após avaliação das suspensões planctônicas dos 5 isolados clínicos de *C. glabrata* (Cg1 – Cg5), em todas as condições experimentais. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	P-L-		P-L+		P+L-		P+L+		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> F		PDT 18J/cm <sup>2</sup> F		PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> F		PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> F																																				
	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*																																	
Cg1	4,18E+06	5,53E+06	3,72E+06	4,44E+06	4,12E+06	4,92E+04	8,60E+03	1,80E+02	5,16E+03	1,30E+03	0,00E+00	4,99E+03	2,50E+03	0,00E+00	5,16E+03	1,10E+03	0,00E+00	3,58E+06	2,67E+06	4,18E+06	4,14E+06	3,38E+06	4,32E+04	2,32E+03	2,00E+02	4,32E+04	1,10E+03	0,00E+00	5,13E+04	9,00E+02	0,00E+00	3,11E+04	2,50E+03	0,00E+00																	
	5,21E+06	4,11E+06	4,19E+06	3,87E+06	4,19E+06	4,22E+06	6,70E+03	2,10E+02	5,21E+04	9,00E+02	0,00E+00	4,67E+04	1,50E+03	0,00E+00	5,21E+04	1,60E+03	0,00E+00	2,89E+06	3,66E+06	3,99E+06	3,68E+06	3,69E+06	5,14E+04	4,12E+03	1,59E+02	8,32E+03	9,99E+02	0,00E+00	3,49E+03	1,00E+03	0,00E+00	4,67E+03	9,99E+02	0,00E+00																	
	3,29E+06	3,17E+06	4,12E+06	3,93E+06	3,85E+06	4,11E+04	5,44E+03	1,90E+02	2,80E+04	1,10E+03	0,00E+00	3,11E+04	1,60E+03	0,00E+00	2,80E+04	1,70E+03	0,00E+00	3,86E+06	3,18E+06	3,42E+06	3,80E+06	4,08E+06	3,80E+05	1,88E+05	2,22E+04	3,76E+05	1,88E+05	4,26E+04	6,12E+03	2,78E+05	5,92E+04	4,36E+04	3,50E+06	3,22E+06	4,18E+06	4,18E+06	3,38E+06	4,30E+05	2,58E+05	2,10E+04	4,48E+05	1,26E+03	3,10E+05	2,88E+04	5,18E+04	2,54E+05	6,10E+04	4,58E+03			
	3,28E+06	3,21E+06	4,22E+06	3,68E+06	3,64E+06	4,10E+05	1,88E+05	1,02E+04	3,54E+05	2,10E+05	1,98E+03	2,89E+05	3,86E+04	7,72E+03	3,11E+05	6,67E+04	5,56E+03	3,64E+06	3,72E+06	4,22E+06	3,26E+06	3,24E+06	4,00E+05	1,39E+05	1,10E+04	4,10E+05	4,18E+04	4,98E+04	2,68E+05	5,86E+04	4,58E+04	4,60E+06	3,56E+06	3,97E+06	3,14E+06	3,90E+06	3,99E+05	1,34E+05	1,61E+04	2,01E+05	7,51E+04	9,38E+03	1,83E+05	3,80E+04	5,67E+03	2,98E+05	6,14E+04	2,26E+04			
	2,74E+06	2,16E+06	3,72E+06	3,72E+06	3,46E+06	3,58E+05	2,80E+02	2,00E+01	1,20E+05	4,00E+02	6,00E+01	1,60E+05	2,46E+02	5,50E+01	1,30E+05	1,46E+02	6,70E+01	3,28E+06	3,48E+06	3,72E+06	3,04E+06	3,96E+06	2,16E+05	1,06E+03	6,20E+02	1,28E+05	7,00E+02	4,50E+01	1,64E+05	7,79E+02	2,70E+01	2,04E+05	4,79E+02	3,10E+01	3,64E+06	3,82E+06	3,70E+06	3,14E+06	3,62E+06	4,12E+05	8,79E+02	9,73E+02	1,14E+05	3,87E+02	7,80E+01	1,26E+05	3,59E+02	5,90E+01	1,46E+05	3,67E+02	3,30E+01
2,90E+06	3,15E+06	3,90E+06	3,00E+06	3,92E+06	3,27E+05	2,16E+03	4,20E+02	1,00E+05	7,49E+02	5,40E+01	2,38E+05	3,74E+02	6,60E+01	1,98E+05	3,21E+02	6,10E+01	2,78E+06	3,48E+06	3,83E+06	3,12E+06	3,79E+06	3,33E+05	1,20E+03	3,98E+02	1,26E+05	3,59E+02	5,90E+01	1,12E+05	6,89E+02	8,90E+01	2,12E+05	7,01E+02	7,00E+01	4,36E+06	3,34E+06	3,36E+06	3,60E+06	3,14E+06	4,60E+05	3,94E+04	3,80E+02	2,72E+05	2,08E+05	2,28E+04	7,20E+01	3,28E+05	2,70E+04	8,60E+01			
Cg4	4,86E+06	3,22E+06	3,18E+06	3,98E+06	3,48E+06	2,46E+05	2,34E+04	2,80E+02	1,70E+05	1,34E+04	3,80E+01	1,82E+05	1,62E+04	8,00E+01	2,58E+05	3,18E+04	8,00E+01	3,76E+06	3,31E+06	4,06E+06	3,30E+06	4,16E+06	3,47E+05	4,12E+04	2,90E+02	2,04E+05	2,08E+04	3,40E+01	2,70E+05	1,37E+04	3,80E+01	2,28E+05	2,28E+04	7,20E+01	3,82E+06	4,57E+06	4,74E+06	4,52E+06	3,64E+06	4,49E+05	2,29E+04	3,70E+02	1,73E+05	1,99E+04	3,40E+01	2,72E+05	2,08E+04	2,20E+01			
	3,81E+06	3,99E+06	3,95E+06	3,93E+06	3,45E+06	3,82E+05	3,22E+04	3,37E+02	1,05E+05	1,19E+04	3,30E+01	1,73E+05	1,25E+04	5,80E+01	2,61E+05	2,44E+04	2,60E+01	3,08E+06	2,86E+06	3,66E+06	3,62E+06	3,20E+06	5,42E+04	3,00E+03	1,48E+03	2,34E+04	1,62E+03	8,00E+01	3,42E+04	3,40E+03	2,00E+01	2,76E+04	1,30E+03	1,60E+02	3,30E+06	2,92E+06	3,82E+06	3,50E+06	3,88E+06	3,50E+04	1,78E+03	4,60E+02	2,88E+04	2,40E+03	0,00E+00	4,46E+04	1,26E+03	2,00E+01			
	3,82E+06	2,89E+06	2,96E+06	3,00E+06	3,92E+06	3,99E+04	2,50E+03	1,38E+03	1,24E+04	2,50E+03	9,90E+01	2,65E+04	2,36E+03	8,00E+01	3,42E+04	3,40E+03	2,00E+01	3,82E+06	2,89E+06	2,96E+06	3,00E+06	3,92E+06	3,99E+04	2,50E+03	1,38E+03	1,24E+04	1,02E+03	9,90E+01	2,65E+04	2,36E+03	8,00E+01	3,42E+04	3,40E+03	2,00E+01	3,88E+06	3,62E+06	3,72E+06	3,56E+06	3,14E+06	4,71E+04	3,68E+03	6,60E+02	1,44E+04	1,01E+03	1,68E+02	1,98E+04	2,99E+03	2,00E+02	2,88E+04	2,40E+03	0,00E+00
	2,87E+06	3,34E+06	3,30E+06	2,79E+06	3,00E+06	4,74E+04	1,74E+03	1,14E+02	1,07E+04	1,00E+03	8,40E+01	1,31E+04	1,02E+03	9,90E+01	2,65E+04	2,36E+03	8,00E+01	2,87E+06	3,34E+06	3,30E+06	2,79E+06	3,00E+06	4,74E+04	1,74E+03	1,14E+02	1,07E+04	1,00E+03	8,40E+01	1,31E+04	1,02E+03	9,90E+01	2,65E+04	2,36E+03	8,00E+01	2,87E+06	3,34E+06	3,30E+06	2,79E+06	3,00E+06	4,74E+04	1,74E+03	1,14E+02	1,07E+04	1,00E+03	8,40E+01	1,31E+04	1,02E+03	9,90E+01	2,65E+04	2,36E+03	8,00E+01

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

Tabela A34- Medidas de resumo, em  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$ , calculadas para as amostras de todas as condições experimentais, considerando os resultados provenientes da avaliação de cinco isolados clínicos de *C. glabrata* (suspensões planctônicas). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de	P-L-		P-L+		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> F			PDT 18J/cm <sup>2</sup> F			PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> F			PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> F			
	P-L-	P-L+	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*	5μM*	10μM*	20μM*
Resumo																	
Média	6,55	6,53	6,58	6,55	6,56	5,19	3,96	2,84	4,86	3,62	1,85	4,90	3,59	1,83	4,97	3,64	1,79
Mediana	6,56	6,52	6,58	6,56	6,56	5,51	3,74	2,60	5,06	3,04	1,78	5,10	3,40	1,78	5,30	3,38	1,79
Variância	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,21	0,73	0,61	0,35	0,88	1,60	0,33	0,54	2,05	0,32	0,73	2,11
Desvio padrão	0,07	0,08	0,05	0,06	0,04	0,46	0,86	0,78	0,59	0,94	1,26	0,58	0,74	1,43	0,56	0,85	1,45
Mínimo	6,44	6,33	6,47	6,45	6,48	4,54	2,45	1,32	3,71	2,56	0,00	3,54	2,39	0,00	3,67	2,17	0,00
Máximo	6,72	6,74	6,68	6,66	6,63	5,66	5,41	4,32	5,65	5,32	4,35	5,61	4,63	4,71	5,52	4,82	4,66

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

Tabela A35- Sumário da ANOVA empregada para o modelo linear aninhado

	gl Numer.	gl Denom.	Estatística F	P-valor
(Intercept)	1	340,00	2584,87	0,00
Grupo	16	68,00	22,93	0,00
$\hat{\sigma}^2$ :	0,0653			
$\hat{\sigma}_{\text{err}}^2$ :	0,8068			

$\sigma^2$ : variância dos grupos

$\sigma_{\text{err}}^2$ : variância dos efeitos aleatórios

7.2 *Apêndice Capítulo 2*

Tabela A36- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de <math>\log_{10}</math></b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	6,55	a
P-L+ 35,5J/cm <sup>2</sup>	6,53	a
P+L- 5μM	6,58	a
P+L- 10μM	6,55	a
P+L- 20μM	6,56	a
P+L+ 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	5,19	ab
P+L+ 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	3,96	bc
P+L+ 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	2,84	cde
P+L+ 18J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	4,86	ab
P+L+ 18J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	3,62	bcde
P+L+ 18J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	1,85	de
P+L+ 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	4,90	ab
P+L+ 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	3,59	bcde
P+L+ 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	1,83	de
P+L+ 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	4,97	ab
P+L+ 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	3,64	bcde
P+L+ 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	1,79	e

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).



## 7.2 Apêndice Capítulo 2

### A.3- Isolados clínicos de *C. tropicalis*

Os valores originais de ufc/mL obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A37. Após a transformação dos valores de ufc/mL em logaritmo (base 10), procedeu-se a análise descritiva dos dados, que está apresentada na Tabela A38. Conforme descrito para as outras espécies, a análise inferencial foi realizada por meio de um modelo ANOVA aninhando, no qual o fator fixo foi representado pelos grupos experimentais, e o fator aleatório foi representado pelos diferentes isolados dentro de cada grupo. Esta análise se baseou na utilização de um modelo linear com erros distribuídos normalmente e variâncias entre grupos apresentando homocedasticidade para o fator fixo, e fatores aleatórios distribuídos normalmente com variância constante. Para a realização da ANOVA, as seguintes hipóteses nulas ( $H_0$ ) foram determinadas:  $H_{01}$ - As médias dos grupos são iguais a uma média global, o que significa que não há grupos com médias estatisticamente diferentes;  $H_{02}$ - Os isolados dentro dos grupos não afetam a variabilidade global dos dados, ou seja, a variância dos efeitos aleatórios é igual à zero. Os resultados desta análise estão na Tabela A39.

Os resultados indicaram que a  $H_{01}$  foi rejeitada com p-valor inferior a 0,0001. Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas para se determinar onde se localizavam as diferenças entre os grupos estudados. O resumo desta análise está na Tabela 40. Para a decisão sobre a  $H_{02}$ , foi determinado o intervalo de confiança (IC 95%) da variância dos efeitos aleatórios ( $\sigma_{ea}$ ), pois se o valor zero estivesse incluído no intervalo, a  $H_{02}$  deveria ser aceita. O IC 95% calculado foi de  $0,5422329 < \sigma_{ea} < 0,7917113$ , e, portanto, o valor zero não estava incluído no intervalo, o que levou a rejeição da  $H_{02}$ . Além disso, foi determinado que 98,8% da variabilidade observada dentro dos grupos pôde ser explicada pela utilização de diferentes cepas [ $\sigma_{ea}^2 / (\sigma^2 + \sigma_{ea}^2)$ ].

Tabela A37- Valores originais de ufc/mL obtidos após avaliação das suspensões planctônicas dos 5 isolados clínicos de *C. tropicalis* (Ct1 – Ct5), em todas as condições experimentais. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	P-L-		P+L-		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> F		PDT 18J/cm <sup>2</sup> F		PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> F		PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> F	
	37,5J/cm <sup>2</sup> F	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*	5μM* 10μM* 20μM*
Ct1	4,24E+05	3,78E+05	4,52E+05	3,40E+02	0,00E+00	0,00E+00	2,60E+01	0,00E+00	0,00E+00	3,10E+01	0,00E+00	2,20E+01
	3,04E+05	3,66E+05	3,60E+05	3,44E+05	2,00E+02	0,00E+00	2,60E+01	0,00E+00	0,00E+00	1,50E+01	0,00E+00	3,60E+01
	4,24E+05	3,92E+05	3,77E+05	3,25E+05	2,90E+02	0,00E+00	1,90E+01	0,00E+00	0,00E+00	2,90E+01	0,00E+00	1,60E+01
	4,12E+05	3,52E+05	3,69E+05	3,76E+05	2,13E+02	0,00E+00	3,40E+01	0,00E+00	0,00E+00	4,10E+01	0,00E+00	2,20E+01
	3,94E+05	4,01E+05	4,65E+05	4,22E+05	2,42E+02	0,00E+00	2,80E+01	0,00E+00	0,00E+00	1,70E+01	0,00E+00	1,70E+01
Ct2	2,56E+05	2,22E+05	2,38E+05	3,42E+05	7,00E+02	2,40E+02	6,00E+01	1,80E+02	2,00E+01	3,40E+02	3,10E+01	2,09E+02
	1,64E+05	2,46E+05	3,46E+05	2,56E+05	6,20E+02	4,70E+01	1,20E+01	1,00E+02	3,60E+01	5,00E+02	2,20E+01	6,27E+02
	3,12E+05	2,93E+05	3,47E+05	2,29E+05	5,69E+02	1,28E+02	6,00E+01	1,05E+02	1,50E+01	1,07E+02	3,10E+01	3,40E+02
	2,44E+05	3,15E+05	1,97E+05	2,75E+05	6,43E+02	7,50E+01	1,80E+01	1,10E+02	1,80E+01	1,05E+02	1,50E+01	4,71E+02
	3,30E+05	2,99E+05	2,51E+05	2,92E+05	3,00E+05	6,35E+02	1,29E+02	3,90E+01	1,05E+02	1,42E+02	2,60E+01	1,14E+02
Ct3	1,98E+05	3,72E+05	1,92E+05	2,24E+05	8,20E+02	0,00E+00	0,00E+00	2,00E+01	0,00E+00	1,40E+02	0,00E+00	5,60E+01
	1,49E+05	3,80E+05	3,86E+05	2,02E+05	2,26E+05	1,00E+03	0,00E+00	1,16E+02	0,00E+00	1,36E+02	0,00E+00	4,00E+01
	1,44E+05	4,12E+05	2,62E+05	1,84E+05	9,70E+02	0,00E+00	0,00E+00	6,80E+01	0,00E+00	5,40E+01	0,00E+00	1,14E+02
	1,54E+05	3,80E+05	1,92E+05	2,76E+05	1,00E+03	0,00E+00	0,00E+00	1,03E+02	0,00E+00	6,10E+01	0,00E+00	1,37E+02
	2,01E+05	4,30E+05	2,12E+05	2,12E+05	2,38E+05	9,48E+02	0,00E+00	0,00E+00	7,70E+01	4,70E+01	0,00E+00	7,70E+01
Ct4	1,70E+06	1,52E+06	1,62E+06	1,74E+06	4,40E+02	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	1,30E+06	1,56E+06	1,72E+06	1,66E+06	9,60E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	1,56E+06	1,72E+06	1,78E+06	1,88E+06	4,85E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	1,48E+06	1,62E+06	1,43E+06	1,52E+06	9,97E+02	3,50E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	1,64E+06	1,36E+07	1,67E+06	1,80E+06	7,23E+02	1,40E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Ct5	3,26E+05	3,72E+05	3,32E+05	3,66E+05	1,66E+03	2,00E+01	0,00E+00	7,80E+02	0,00E+00	1,60E+02	0,00E+00	3,28E+02
	3,56E+05	3,76E+05	3,66E+05	3,66E+05	1,74E+03	1,00E+02	0,00E+00	1,88E+02	0,00E+00	6,00E+02	0,00E+00	1,21E+02
	3,52E+05	3,86E+05	3,82E+05	3,52E+05	3,36E+05	2,16E+03	3,70E+01	0,00E+00	0,00E+00	2,79E+02	0,00E+00	1,05E+02
	3,57E+05	3,36E+05	3,26E+05	3,16E+05	3,86E+05	2,71E+03	9,90E+01	0,00E+00	0,00E+00	5,91E+02	0,00E+00	5,91E+02
	3,49E+05	3,63E+05	3,34E+05	3,42E+05	3,80E+05	2,09E+03	6,90E+01	0,00E+00	7,12E+02	0,00E+00	0,00E+00	2,71E+02

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

Tabela A38- Medidas de resumo, em  $\log_{10}(\text{ufc/mL})$ , calculadas para as amostras de todas as condições experimentais, considerando os resultados provenientes da avaliação de cinco isolados clínicos de *C. tropicalis* (suspensões planctônicas). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-		P-L+		P+L-		PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> T		PDT 18J/cm <sup>2</sup> T		PDT 25,5J/cm <sup>2</sup> T		PDT 37,5J/cm <sup>2</sup> T										
	5,54	5,59	5,71	37,5J/cm <sup>2</sup> T	5,65	5,62	5,64	20µM*	5µM*	2,87	0,92	0,30	1,59	0,27	0,00	1,61	0,28	0,00	0,00	1,62	0,29	0,00	
Média	5,54	5,59	5,71	37,5J/cm <sup>2</sup> T	5,65	5,62	5,64	20µM*	5µM*	2,87	0,92	0,30	1,59	0,27	0,00	1,61	0,28	0,00	0,00	1,62	0,29	0,00	0,00
Mediana	5,54	5,59	5,71	37,5J/cm <sup>2</sup> T	5,65	5,62	5,64	20µM*	5µM*	2,87	0,92	0,30	1,59	0,27	0,00	1,61	0,28	0,00	0,00	1,62	0,29	0,00	0,00
Variância	0,11	0,11	0,14	37,5J/cm <sup>2</sup> T	0,09	0,10	0,10	0,10	0,88	0,40	0,85	0,30	0,00	0,00	0,00	0,86	0,33	0,00	0,00	0,89	0,35	0,00	0,00
Desvio padrão	0,34	0,34	0,37	37,5J/cm <sup>2</sup> T	0,29	0,32	0,31	0,31	0,94	0,63	0,92	0,55	0,00	0,00	0,00	0,93	0,57	0,00	0,00	0,94	0,59	0,00	0,00
Mínimo	5,16	5,16	5,41	37,5J/cm <sup>2</sup> T	5,29	5,28	5,26	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	6,23	6,23	7,13	37,5J/cm <sup>2</sup> T	6,24	6,25	6,27	3,43	2,38	1,79	2,89	1,57	0,00	0,00	0,00	2,78	1,51	0,00	0,00	2,80	1,56	0,00	0,00

\*: Concentrações de Curcumina

T: Doses de luz

Tabela A39- Sumário da ANOVA empregada para o modelo linear aninhado.

	gl	Numer.	gl	Denom.	Estatística F	P-valor
(Intercept)	1		280,00		1192,75	0,00
Grupo	13		56,00		65,25	0,00
$\hat{\sigma}^2$ :			0,07120			
$\hat{\sigma}_{\text{ea}}^2$ :			0,6552			

$\sigma$ : variância dos grupos

$\sigma_{\text{ea}}$ : variância dos efeitos aleatórios

7.2 *Apêndice Capítulo 2*

Tabela A40- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de <math>\log_{10}</math></b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	5,59	a
P-L+ 35,5J/cm <sup>2</sup>	5,71	a
P+L- 5μM	5,65	a
P+L- 10μM	5,62	a
P+L- 20μM	5,64	a
P+L+ 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	2,87	b
P+L+ 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	0,92	c
P+L+ 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,30	c
P+L+ 18J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	1,59	bc
P+L+ 18J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	0,27	c
P+L+ 18J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-
P+L+ 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	1,61	bc
P+L+ 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	0,28	c
P+L+ 25,5J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-
P+L+ 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 5μM	1,62	bc
P+L+ 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 10μM	0,29	c
P+L+ 37,5J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,00	-

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p>0,05$ ).

-: grupo não avaliado

7.2 *Apêndice Capítulo 2**B- Metabolismo celular (XTT)**B.1- Isolados clínicos de C. albicans*

Os valores originais de absorvância obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A41.

Tabela A41- Valores originais de absorvância obtidos após avaliação do metabolismo dos biofilmes formados a partir dos 5 isolados clínicos de *C. albicans* (Ca1 – Ca5), em todas as condições experimentais. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	P-L-	PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> F			PDT 18J/cm <sup>2</sup> F		
		20μM*	30μM*	40μM*	20μM*	30μM*	40μM*
Ca1	1,321	0,424	0,341	0,158	0,447	0,297	0,142
	1,339	0,409	0,327	0,129	0,464	0,329	0,126
	1,331	0,440	0,394	0,125	0,481	0,332	0,112
	1,235	0,406	0,427	0,176	0,470	0,383	0,114
	1,278	0,440	0,391	0,200	0,418	0,318	0,179
Ca2	1,274	0,871	0,676	0,373	0,579	0,300	0,122
	1,306	0,904	0,690	0,314	0,546	0,261	0,188
	1,283	0,862	0,605	0,450	0,618	0,237	0,185
	1,257	0,921	0,676	0,379	0,571	0,366	0,154
	1,351	0,942	0,701	0,446	0,507	0,384	0,168
Ca3	0,970	0,404	0,277	0,102	0,335	0,224	0,085
	0,914	0,343	0,258	0,084	0,365	0,217	0,071
	0,891	0,399	0,223	0,101	0,355	0,223	0,021
	0,863	0,403	0,207	0,186	0,338	0,230	0,960
	0,955	0,335	0,312	0,157	0,363	0,232	0,102
Ca4	1,172	0,350	0,350	0,223	0,331	0,153	0,173
	1,194	0,375	0,360	0,159	0,373	0,182	0,164
	1,038	0,318	0,315	0,271	0,304	0,199	0,116
	1,179	0,338	0,320	0,161	0,254	0,193	0,107
	1,140	0,387	0,298	0,224	0,309	0,658	0,162
Ca5	1,297	0,505	0,310	0,203	0,528	0,321	0,166
	1,341	0,468	0,458	0,262	0,477	0,417	0,170
	1,353	0,456	0,438	0,212	0,490	0,408	0,234
	1,163	0,466	0,364	0,267	0,481	0,357	0,145
	1,208	0,498	0,332	0,241	0,506	0,300	0,274

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados, e as principais medidas de resumo calculadas estão apresentadas na Tabela A42. A análise inferencial foi realizada por meio de um modelo ANOVA aninhando, no qual o fator fixo foi representado pelos grupos experimentais, e o fator aleatório foi representado pelos diferentes isolados dentro de cada grupo. Esta análise se baseou na utilização de um modelo linear com erros distribuídos normalmente e variâncias entre grupos apresentando homocedasticidade para o fator fixo, e fatores aleatórios distribuídos normalmente com variância constante. Para a realização da ANOVA, as seguintes hipóteses nulas ( $H_0$ ) foram determinadas:  $H_{01}$ - As médias dos grupos são iguais a uma média global, o que significa que não há grupos com médias estatisticamente diferentes;  $H_{02}$ - Os isolados dentro dos grupos não afetam a variabilidade global dos dados, ou seja, a variância dos efeitos aleatórios é igual à zero. Os resultados desta análise estão na Tabela A43.

Os resultados indicaram que a  $H_{01}$  foi rejeitada com p-valor inferior a 0,0001. Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas para se determinar onde se localizavam as diferenças entre os grupos estudados. O resumo desta análise está na Tabela A44.

Tabela A42- Medidas de resumo calculadas para as amostras de todas as condições experimentais, considerando os resultados provenientes da avaliação do metabolismo (XTT, absorvância) dos biofilmes formados com 5 isolados clínicos de *C. albicans*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-	PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> <sup>F</sup>			PDT 18J/cm <sup>2</sup> <sup>F</sup>		
		20µM*	30µM*	40µM*	20µM*	30µM*	40µM*
Média	1,186	0,507	0,402	0,224	0,436	0,301	0,178
Mediana	1,235	0,424	0,350	0,203	0,464	0,300	0,154
Variância	0,025	0,043	0,022	0,010	0,010	0,011	0,029
Desvio padrão	0,157	0,207	0,150	0,102	0,098	0,106	0,171
Mínimo	0,863	0,318	0,207	0,084	0,254	0,153	0,021
Máximo	1,353	0,942	0,701	0,450	0,618	0,658	0,960

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A43- Sumário da ANOVA empregada para o modelo linear aninhado

	gl Numer.	gl Denom.	Estatística F	P-valor
(Intercept)	1	140	391,69	<0,0001
Grupo	6	28	29,06	<0,0001
$\hat{\sigma}^2$ :	0,05682			
$\hat{\sigma}_{ea}^2$ :	0,1367			

$\sigma$ : variância dos grupos

$\sigma_{ea}$ : variância dos efeitos aleatórios

Tabela A44- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

Condições Experimentais	Média de XTT	Teste Tukey*
P-L-	1,186	a
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,507	b
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 30μM	0,402	bc
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 40μM	0,224	c
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,436	bc
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 30μM	0,301	bc
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 40μM	0,178	c

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Para a decisão sobre a  $H_{02}$ , foi determinado o intervalo de confiança (IC 95%) da variância dos efeitos aleatórios ( $\sigma_{ea}$ ), pois se o valor zero estivesse incluído no intervalo, a  $H_{02}$  deveria ser aceita. O IC 95% calculado foi de  $0,1044753 < \sigma_{ea} < 0,1788562$ , e, portanto, o valor zero não estava incluído no intervalo, o que levou a rejeição da  $H_{02}$ . Além disso, foi determinado que 85,26% da variabilidade observada dentro dos grupos pôde ser explicada pela utilização de diferentes cepas [ $\sigma_{ea}^2 / (\sigma^2 + \sigma_{ea}^2)$ ].

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

B.2- Isolados clínicos de *C. glabrata*

Os valores originais de absorvância obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A45.

Tabela A45- Valores originais de absorvância obtidos após avaliação do metabolismo dos biofilmes formados a partir dos 5 isolados clínicos de *C. glabrata* (Cg1 – Cg5), em todas as condições experimentais. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	P-L-	PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> †			PDT 18J/cm <sup>2</sup> †		
		20µM*	30µM*	40µM*	20µM*	30µM*	40µM*
Cg1	1,387	0,674	0,448	0,268	0,448	0,267	0,251
	0,945	0,553	0,477	0,273	0,477	0,212	0,167
	1,054	0,690	0,509	0,219	0,509	0,253	0,294
	1,343	0,580	0,373	0,199	0,473	0,284	0,197
	1,085	0,795	0,479	0,206	0,479	0,188	0,206
Cg2	0,761	0,197	0,182	0,109	0,232	0,163	0,157
	0,886	0,252	0,212	0,177	0,177	0,100	0,038
	0,874	0,220	0,244	0,146	0,222	0,107	0,149
	0,751	0,227	0,273	0,198	0,185	0,149	0,162
	0,793	0,275	0,277	0,188	0,169	0,052	0,157
Cg3	0,724	0,469	0,284	0,154	0,307	0,288	0,057
	0,846	0,365	0,237	0,138	0,191	0,277	0,176
	0,852	0,394	0,198	0,175	0,275	0,254	0,132
	0,671	0,483	0,276	0,209	0,346	0,271	0,069
	0,796	0,498	0,222	0,149	0,266	0,188	0,111
Cg4	1,054	0,458	0,267	0,191	0,221	0,131	0,088
	1,108	0,397	0,342	0,166	0,261	0,147	0,065
	0,938	0,421	0,286	0,139	0,240	0,144	0,103
	0,844	0,439	0,212	0,134	0,262	0,168	0,075
	0,726	0,477	0,301	0,172	0,209	0,170	0,119
Cg5	1,101	0,829	0,397	0,125	0,333	0,247	0,011
	0,963	0,648	0,212	0,187	0,347	0,238	0,197
	1,026	0,700	0,226	0,210	0,298	0,249	0,188
	0,856	0,783	0,376	0,220	0,357	0,246	0,134
	0,989	0,866	0,393	0,192	0,333	0,199	0,117

\*: Concentrações de Curcumina

†: Doses de luz



## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados, e as principais medidas de resumo calculadas estão apresentadas na Tabela 46. A análise inferencial foi realizada por meio de um modelo ANOVA aninhando, no qual o fator fixo foi representado pelos grupos experimentais, e o fator aleatório foi representado pelos diferentes isolados dentro de cada grupo. Esta análise se baseou na utilização de um modelo linear com erros distribuídos normalmente e variâncias entre grupos apresentando homocedasticidade para o fator fixo, e fatores aleatórios distribuídos normalmente com variância constante. Para a realização da ANOVA, as seguintes hipóteses nulas ( $H_0$ ) foram determinadas:  $H_{01}$ - As médias dos grupos são iguais a uma média global, o que significa que não há grupos com médias estatisticamente diferentes;  $H_{02}$ - Os isolados dentro dos grupos não afetam a variabilidade global dos dados, ou seja, a variância dos efeitos aleatórios é igual à zero. Os resultados desta análise estão na Tabela A47.

Os resultados indicaram que a  $H_{01}$  foi rejeitada com p-valor inferior a 0,0001. Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas para se determinar onde se localizavam as diferenças entre os grupos estudados. O resumo desta análise está na Tabela A48.

Tabela A46- Medidas de resumo calculadas para as amostras de todas as condições experimentais, considerando os resultados provenientes da avaliação do metabolismo (XTT, absorvância) dos biofilmes formados com 5 isolados clínicos de *C. glabrata*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-	PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> <sup>F</sup>			PDT 18J/cm <sup>2</sup> <sup>F</sup>		
		20µM*	30µM*	40µM*	20µM*	30µM*	40µM*
Média	0,935	0,508	0,308	0,182	0,305	0,200	0,137
Mediana	0,886	0,477	0,277	0,187	0,275	0,199	0,134
Variância	0,033	0,040	0,009	0,002	0,011	0,004	0,004
Desvio padrão	0,181	0,200	0,097	0,041	0,104	0,065	0,067
Mínimo	0,671	0,197	0,182	0,109	0,169	0,052	0,011
Máximo	1,387	0,866	0,509	0,273	0,509	0,288	0,294

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A47- Sumário da ANOVA empregada para o modelo linear aninhado

	gl Numer.	gl Denom.	Estatística F	P-valor
(Intercept)	1	140,00	342,09	<0,0001
Grupo	6	28,00	27,47	<0,0001
$\hat{\sigma}^2$ :	0,1275			
$\hat{\sigma}_{ea}^2$ :	0,1085			

$\sigma$ : variância dos grupos

$\sigma_{ea}$ : variância dos efeitos aleatórios

Tabela A48- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

Condições Experimentais	Média de XTT	Teste Tukey*
P-L-	0,935	a
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,508	b
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 30μM	0,308	bc
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 40μM	0,182	c
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,305	bc
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 30μM	0,200	c
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 40μM	0,137	c

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Para a decisão sobre a  $H_{02}$ , foi determinado o intervalo de confiança (IC 95%) da variância dos efeitos aleatórios ( $\sigma_{ea}$ ), pois se o valor zero estivesse incluído no intervalo, a  $H_{02}$  deveria ser aceita. O IC 95% calculado foi de  $0,08128011 < \sigma_{ea} < 0,1448888$ , e, portanto, o valor zero não estava incluído no intervalo, o que levou a rejeição da  $H_{02}$ . Além disso, foi determinado que 42% da variabilidade observada dentro dos grupos pôde ser explicada pela utilização de diferentes cepas [ $\sigma_{ea}^2 / (\sigma^2 + \sigma_{ea}^2)$ ].

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

B.3- Isolados clínicos de *C. tropicalis*

Os valores originais de absorvância obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A49.

Tabela A49- Valores originais de absorvância obtidos após avaliação do metabolismo dos biofilmes formados a partir dos 5 isolados clínicos de *C. tropicalis* (Ct1 – Ct5), em todas as condições experimentais. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	P-L-	PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> †			PDT 18J/cm <sup>2</sup> †		
		20µM*	30µM*	40µM*	20µM*	30µM*	40µM*
Ct1	0,718	0,492	0,349	0,260	0,275	0,185	0,171
	0,669	0,505	0,335	0,272	0,251	0,197	0,189
	0,679	0,540	0,324	0,223	0,258	0,200	0,193
	0,734	0,483	0,284	0,199	0,325	0,184	0,125
	0,766	0,555	0,301	0,206	0,302	0,199	0,168
Ct2	0,611	0,434	0,334	0,196	0,352	0,123	0,080
	0,607	0,416	0,281	0,198	0,319	0,134	0,075
	0,615	0,441	0,276	0,221	0,356	0,126	0,100
	0,782	0,482	0,357	0,247	0,381	0,127	0,028
	0,711	0,444	0,283	0,168	0,347	0,169	0,07
Ct3	0,651	0,471	0,345	0,356	0,392	0,324	0,305
	0,600	0,444	0,349	0,332	0,419	0,337	0,306
	0,636	0,434	0,361	0,367	0,401	0,318	0,280
	0,699	0,421	0,316	0,355	0,356	0,312	0,264
	0,623	0,453	0,381	0,294	0,402	0,367	0,238
Ct4	0,699	0,615	0,458	0,286	0,515	0,423	0,255
	0,793	0,590	0,457	0,275	0,549	0,390	0,276
	0,782	0,655	0,489	0,290	0,535	0,392	0,210
	0,826	0,627	0,481	0,257	0,555	0,328	0,214
	0,830	0,586	0,499	0,237	0,496	0,321	0,2
Ct5	0,436	0,317	0,305	0,205	0,264	0,224	0,172
	0,423	0,308	0,312	0,224	0,215	0,214	0,104
	0,423	0,303	0,310	0,206	0,220	0,211	0,164
	0,583	0,354	0,351	0,214	0,205	0,210	0,132
	0,594	0,301	0,302	0,286	0,241	0,209	0,128

\*: Concentrações de Curcumina

†: Doses de luz

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados, e as principais medidas de resumo calculadas estão apresentadas na Tabela A50. A análise inferencial foi realizada por meio de um modelo ANOVA aninhando, no qual o fator fixo foi representado pelos grupos experimentais, e o fator aleatório foi representado pelos diferentes isolados dentro de cada grupo. Esta análise se baseou na utilização de um modelo linear com erros distribuídos normalmente e variâncias entre grupos apresentando homocedasticidade para o fator fixo, e fatores aleatórios distribuídos normalmente com variância constante. Para a realização da ANOVA, as seguintes hipóteses nulas ( $H_0$ ) foram determinadas:  $H_{01}$ - As médias dos grupos são iguais a uma média global, o que significa que não há grupos com médias estatisticamente diferentes;  $H_{02}$ - Os isolados dentro dos grupos não afetam a variabilidade global dos dados, ou seja, a variância dos efeitos aleatórios é igual à zero. Os resultados desta análise estão na Tabela A51.

Os resultados indicaram que a  $H_{01}$  foi rejeitada com p-valor inferior a 0,0001. Em seguida, foram realizadas comparações múltiplas para se determinar onde se localizavam as diferenças entre os grupos estudados. O resumo desta análise está na Tabela A52.

Tabela A50- Medidas de resumo calculadas para as amostras de todas as condições experimentais, considerando os resultados provenientes da avaliação do metabolismo (XTT, absorvância) dos biofilmes formados com 5 isolados clínicos de *C. tropicalis*. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	P-L-	PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> <sup>F</sup>			PDT 18J/cm <sup>2</sup> <sup>F</sup>		
		20µM*	30µM*	40µM*	20µM*	30µM*	40µM*
Média	0,660	0,467	0,354	0,255	0,357	0,249	0,178
Mediana	0,669	0,453	0,335	0,247	0,352	0,211	0,172
Variância	0,013	0,010	0,005	0,003	0,012	0,009	0,006
Desvio padrão	0,115	0,102	0,069	0,056	0,108	0,093	0,078
Mínimo	0,423	0,301	0,276	0,168	0,205	0,123	0,028
Máximo	0,830	0,655	0,499	0,367	0,555	0,423	0,306

\*: Concentrações de Curcumina

F: Doses de luz

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A51- Sumário da ANOVA empregada para o modelo linear aninhado

	gl Numer.	gl Denom.	Estatística F	P-valor
(Intercept)	1	140,00	1771,56	<0,0001
Grupo	6	28,00	12,93	<0,0001
$\widehat{\sigma}^2$ :	0,04024			
$\widehat{\sigma}_{\epsilon a}^2$ :	0,08078			

$\sigma$ : variância dos grupos

$\sigma_{\epsilon a}$ : variância dos efeitos aleatórios

Tabela A52- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

Condições Experimentais	Média de XTT	Teste Tukey*
P-L-	0,660	a
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,467	ab
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 30μM	0,354	bc
PDT 5,28J/cm <sup>2</sup> ; 40μM	0,255	cd
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 20μM	0,357	bc
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 30μM	0,249	cd
PDT 18J/cm <sup>2</sup> ; 40μM	0,178	d

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Para a decisão sobre a  $H_02$ , foi determinado o intervalo de confiança (IC 95%) da variância dos efeitos aleatórios ( $\sigma_{\epsilon a}$ ), pois se o valor zero estivesse incluído no intervalo, a  $H_02$  deveria ser aceita. O IC 95% calculado foi de  $0,06175359 < \sigma_{\epsilon a} < 0,105659$ , e, portanto, o valor zero não estava incluído no intervalo, o que levou a rejeição da  $H_02$ . Além disso, foi determinado que 80,1% da variabilidade observada dentro dos grupos pôde ser explicada pela utilização de diferentes cepas [ $\sigma_{\epsilon a}^2 / (\sigma^2 + \sigma_{\epsilon a}^2)$ ].

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

*C- Cristal Violeta (CV)*

Os valores originais de absorvância obtidos em todas as condições experimentais estão apresentados na Tabela A53.

Tabela A53- Valores originais de absorvância obtidos após coloração dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* com cristal violeta, nas condições P-L- e PDT. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Isolado clínico	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	P-L-	PDT *	P-L-	PDT *	P-L-	PDT *
1	1,125	0,604	0,315	0,080	0,274	0,091
	1,289	0,619	0,258	0,134	0,276	0,076
	1,064	0,692	0,300	0,199	0,294	0,101
	1,212	0,605	0,280	0,115	0,271	0,089
	1,149	0,677	0,352	0,061	0,286	0,085
2	1,188	0,556	0,120	0,049	0,309	0,136
	1,026	0,530	0,140	0,021	0,295	0,098
	0,913	0,613	0,147	0,038	0,331	0,118
	0,997	0,584	0,134	0,042	0,284	0,155
	1,142	0,583	0,180	0,012	0,278	0,067
3	0,653	0,242	0,197	0,055	0,275	0,150
	0,638	0,214	0,116	0,084	0,330	0,129
	0,608	0,227	0,233	0,045	0,296	0,086
	0,677	0,194	0,218	0,066	0,312	0,081
	0,667	0,211	0,248	0,014	0,294	0,152
4	1,173	0,377	0,326	0,116	0,350	0,113
	0,938	0,475	0,304	0,067	0,411	0,140
	0,964	0,469	0,287	0,112	0,324	0,097
	0,905	0,417	0,283	0,092	0,294	0,084
	0,197	0,395	0,356	0,087	0,342	0,107
5	1,171	0,366	0,273	0,098	0,281	0,094
	1,147	0,524	0,333	0,101	0,157	0,086
	1,193	0,482	0,282	0,093	0,136	0,059
	0,985	0,475	0,325	0,065	0,216	0,047
	1,166	0,399	0,243	0,083	0,147	0,094

\*: Condição PDT avaliou a associação de 40µM de curcumina com 18J/cm<sup>2</sup>

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados, e as principais medidas de resumo calculadas estão apresentadas na Tabela A54. O objetivo da análise por coloração com CV foi avaliar a biomassa dos biofilmes tratados e não tratados com PDT, para cada espécie de *Candida*. Dessa forma, a análise inferencial adequada a este objetivo seria aquela que possibilitasse a comparação entre dois grupos independentes (P-L- e PDT). Para isso, os resultados obtidos para cada espécie de *Candida* foram avaliados separadamente. Em todos os casos, o teste de Shapiro Wilk foi utilizado para a verificação da normalidade dos dados, ao nível de significância de 5%. O teste resultou em valores de probabilidade inferiores a 0,05 para os grupos das três espécies de *Candida*, indicando a necessidade de utilização de testes não paramétricos. Por essa razão, o teste de Wilcoxon (também conhecido como Mann-Whitney) foi utilizado para realizar as comparações entre os grupos P-L- e PDT de cada espécie avaliada, ao nível de significância de 5%. A hipótese nula testada em todos os casos foi a existência de igualdade entre os grupos. O resultado da análise individual de cada espécie resultou em valor de probabilidade muito inferior a 0,05 ( $< 0,0001$ ), para as três espécies. Assim, foi possível observar que para a média do grupo P-L- foi sempre superior a média do grupo PDT indicando a redução na biomassa dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* após exposição a PDT.

Adicionalmente, também foi realizada uma análise comparativa entre os grupos P-L- das três espécies, com o objetivo de determinar qual das três espécies possuiu maior capacidade de formação de biofilme. De acordo com o resultado do teste de Shapiro-Wilk, os dados não se apresentavam normalmente distribuídos ( $p < 0,05$ ). Além disso, o teste de Bartlett apontou a existência de heterogeneidade de variâncias entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Desta maneira, a comparação entre grupos foi realizada com o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, ao nível de significância de 5%. O resultado deste teste ( $\chi^2_{gl} = 44,1585$  com  $p$ -valor  $< 10^{-9}$ ) apontou a existência de diferença significativa em pelos menos um dos grupos. O resultado do teste não paramétrico de comparações múltiplas (post-hoc) está apresentado na Tabela A55.

## 7.2 Apêndice Capítulo 2

Tabela A54- Medidas de resumo calculadas para os valores de absorvância obtidos após coloração dos biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* com cristal violeta, nas condições P-L- e P+L+. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2011

Medidas de Resumo	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	P-L-	PDT *	P-L-	PDT *	P-L-	PDT *
Média	0,967	0,461	0,250	0,077	0,283	0,101
Mediana	1,026	0,475	0,273	0,080	0,294	0,094
Variância	0,068	0,023	0,006	0,002	0,004	0,001
Desvio padrão	0,261	0,153	0,075	0,041	0,062	0,029
Mínimo	0,197	0,194	0,116	0,012	0,136	0,047
Máximo	1,289	0,692	0,356	0,199	0,411	0,155

\*: Condição PDT avaliou a associação de 40 $\mu$ M de curcumina com 18J/cm<sup>2</sup>

Tabela A55- Resultado das comparações múltiplas entre grupos, por meio do teste não paramétrico, ao nível de significância de 5%.

Espécie	Posto médio	Comparações múltiplas*
<i>C. albicans</i>	61,380	a
<i>C. glabrata</i>	29,380	b
<i>C. tropicalis</i>	23,240	b

\*: letras iguais denotam grupos considerados estatisticamente semelhantes pelo teste não paramétrico ( $p > 0,05$ ).



### 7.3 Capítulo 3

Neste estudo, a PDT foi avaliada por meio da associação entre as concentrações de 20, 40 e 80 $\mu$ M de curcumina com a dose de luz de 37,5J/cm<sup>2</sup> (P+L+). As três concentrações de curcumina também foram utilizadas para a avaliação do efeito do PS sem luz (P+L-). Além disso, a aplicação isolada da luz foi avaliada (P-L+). Os animais com infecção induzida por *C. albicans* que não receberam nenhum tratamento foram denominados de P-L-, e aqueles que não receberam indução da infecção nem tratamento foram denominados de NCG (grupo controle negativo). Para cada condição avaliada, foram utilizados cinco animais. A avaliação da viabilidade de *C. albicans* das amostras foi realizada por meio de contagem de colônias e cálculo das ufc/mL.

Após a transformação dos valores em logaritmo (base 10), procedeu-se a análise descritiva dos dados por meio do cálculo das medidas de resumo (tendência central e variabilidade). Em seguida, 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 a 0,05, indicando que o conjunto dos dados atendia aos pressupostos necessários para utilização de testes paramétricos. Por essa razão, o teste estatístico empregado para comparação das médias dos grupos foi a ANOVA, ao nível de significância de 5%. De acordo com a Tabela A56, o valor de probabilidade encontrado indicou 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 A57.

7.3 *Apêndice Capítulo 3*

Tabela A56- Sumário da Análise de Variância empregada para comparação das médias dos grupos P+L+, P+L-, P-L+ e P-L-

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Grupo	7,0000	138,1614	19,7373	42,1902	0,0000
Residuals	32,0000	14,9702	0,4678		

Tabela A57- Resultado das comparações múltiplas entre as médias dos grupos, por meio do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

<b>Condições Experimentais</b>	<b>Média de <math>\log_{10}</math></b>	<b>Teste Tukey*</b>
P-L-	4,91	a
P-L+ 35,5J/cm <sup>2</sup>	5,45	a
P+L- 20 $\mu$ M	5,53	a
P+L- 40 $\mu$ M	4,99	a
P+L- 80 $\mu$ M	4,53	ab
P+L+ 20 $\mu$ M	3,40	b
P+L+ 40 $\mu$ M	1,34	c
P+L+ 80 $\mu$ M	0,26	c

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

## 8 Anexo

---

---

# 8 Anexo

## 8.1 Página inicial do artigo publicado, referente ao Capítulo 1.

Photochemistry and Photobiology, 2011, 87: 895–903

### Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans*

Lívia N. Dovigo<sup>1</sup>, Ana Cláudia Pavarina<sup>1</sup>, Ana Paula D. Ribeiro<sup>1</sup>, Iguatemy L. Brunetti<sup>2</sup>, Carlos Alberto de S. Costa<sup>1</sup>, Denis P. Jacomassi<sup>3</sup>, Vanderlei S. Bagnato<sup>3</sup> and Cristina Kurachi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Araraquara Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Clinical Analyses, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>3</sup>Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo – USP, São Carlos, SP, Brazil

Received 2 March 2011, accepted 12 April 2011, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x

#### ABSTRACT

This study describes the association of curcumin with light emitting diode (LED) for the inactivation of *Candida albicans*. Suspensions of *Candida* were treated with nine curcumin concentrations and exposed to LED at different fluences. The protocol that showed the best outcomes for *Candida* inactivation was selected to evaluate the effect of the preirradiation time (PIT) on photodynamic therapy (PDT) effectiveness, the uptake of curcumin by *C. albicans* cells and the possible involvement of singlet oxygen in the photodynamic action. Curcumin-mediated PDT was also assessed against biofilms. In addition to the microbiological experiments, similar protocols were tested on a macrophage cell line and the effect was evaluated by Methyl-tetrazolium assay (MTT) and SEM analysis. The optical properties of curcumin were investigated as a function of illumination fluence. When compared with the control group, a statistically significant reduction in *C. albicans* viability was observed after PDT ( $P < 0.05$ ), for both planktonic and biofilm cultures. Photodynamic effect was greatly increased with the presence of curcumin in the surrounding media and the PIT of 20 min improved PDT effectiveness against biofilms. Although PDT was phototoxic to macrophages, the therapy was more effective in inactivating the yeast cell than the defense cell. The spectral changes showed a high photobleaching rate of curcumin.

#### INTRODUCTION

*Candida albicans* and other *Candida* species are important pathogens associated with the opportunistic fungal diseases (1), especially in immunocompromised patients (2) and denture wearers (3). These micro-organisms can cause superficial mucosal infection such as oral candidosis and denture stomatitis, and also disseminate other forms of diseases (4). According to the National Nosocomial Infections Surveillance System (United States), *Candida* spp. are the most common cause of fungal infection in critically ill patients (5). In addition, some investigations have shown that fungi are involved in up to 17% of all nosocomial infections (6,7), and 9–12% of nosocomial blood stream infections (5,8,9). The

treatments available for *Candida* infection are typically drug based and can involve topical and systemic antifungal agents (2). However, antifungal treatment is limited to a very small number of drug substances and the widespread use of these agents, especially the azoles, has resulted in global emergence of antifungal resistance and subsequent treatment failures (10,11). Moreover, due to the fungistatic rather than fungicidal effect of azoles (12), host defenses are essential for eradicating the infection. Therefore, the use ofazole agents for oral candidosis in immunosuppressed patients can be ineffective.

The increasing incidence of fungal infections, coupled with the growing resistance against antifungal agents, has driven research to the development of alternative strategies, such as topical photodynamic therapy (PDT). Conventional applications of PDT include the use of a sensitizing compound and visible light to kill fast growing and tumor cells (13). The extension of PDT as a therapeutic modality for the treatment of some nononcological diseases, including microbial inactivation and treatment of infections, represents a new important field (14). Photodynamic inactivation of micro-organisms is based on the combination of a drug, known as photosensitizer (PS), and the delivery of a visible light of the appropriate wavelength to excite the PS molecule (15). The interactions of the PS in the excited state with oxygen produce cytotoxic species that lead to microbial destruction (15). When compared with other therapies, PDT has several advantages, such as high target specificity (PS can be delivered to cells and light can be focused on the site of the lesion), few undesired side effects and little likelihood of leading to the development of resistance by micro-organisms (16).

Hematoporphyrin derivatives are among the earliest type of PS used (16). The sensitizers commonly used in anticancer PDT are based on porphyrins and their analogs, which can be administered systemically for retention in rapidly proliferating cells (13). In addition, different types of PS have been proposed for antimicrobial PDT. PS interaction with the cellular membranes and intracellular structures is of great relevance in the response to PDT. Due to the vast diversity of micro-organisms, a PS with distinct physicochemical properties may be required. Curcumin is a naturally occurring, intensely yellow pigment that is isolated from rhizomes of the *Curcuma longa* plant (17). It is a constituent of the spice turmeric, and is in worldwide use as a cooking spice, flavoring agent and colorant. An increasing number of investigations

\*Corresponding author email: pavarina@foar.unesp.br (Ana Cláudia Pavarina)  
© 2011 The Authors  
Photochemistry and Photobiology © 2011 The American Society of Photobiology 0031-8655/11

## 8.2 Página inicial do artigo aceito para publicação, referente ao Capítulo 2.

LSM-11-0143.R1(21110) Lasers in Surgery and Medicine 9999:1-8 (2011)

### Susceptibility of Clinical Isolates of *Candida* to Photodynamic Effects of Curcumin

Livia N. Dovigo, MSc,<sup>1</sup> Ana C. Pavarina, PhD,<sup>1\*</sup> Juliana C. Carmello, MSc,<sup>1</sup> Ana L. Machado, PhD,<sup>1</sup> Iguatemy L. Brunetti, PhD,<sup>2</sup> and Vanderlei S. Bagnato, PhD<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Araraquara<sup>02</sup> Dental School, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP 14801-903, Brazil  
<sup>2</sup>School of Pharmaceutics Sciences, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP 14801-902, Brazil  
<sup>3</sup>Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo (USP), São Carlos, SP 13566-250, Brazil

**Background and Objective:** The resistance of *Candida* species to antifungals represents a major challenge for therapeutic and prophylactic strategies. This study evaluated photodynamic therapy (PDT) mediated by Curcumin (CUR) against clinical isolates of *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. glabrata*, both in planktonic and biofilm forms.

**Study Design/Materials and Methods:** Suspensions of *Candida* were treated with three CUR concentrations and exposed to four LED fluences. The protocol that showed the best outcomes for inactivation of the planktonic phase was selected to be evaluated against *Candida* biofilms. In addition, two higher CUR concentrations were tested. The metabolic activity of biofilms was evaluated by means of XTT reduction assay and the biofilm biomass was evaluated using crystal violet (CV) staining assay. Data were analyzed in a mixed model nested ANOVA, Wilcoxon's nonparametric tests, and the Kruskal-Wallis test ( $\alpha = 5\%$ ).

**Results:** The use of CUR in association with light was able to promote a significant antifungal effect against the planktonic form of the yeasts. When using 40  $\mu\text{M}$  of CUR, the metabolic activity of *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* biofilms was reduced by 85%, 85%, and 73%, respectively, at 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ . CUR-mediated PDT also decreased the biofilm biomass of all species evaluated. In addition, CV staining showed that *C. albicans* isolates were strong biofilm-forming strains, when compared with *C. glabrata* and *C. tropicalis* isolates.

**Conclusion:** The results from the present investigation showed that low CUR concentrations can be highly effective for inactivating *Candida* isolates when associated with light excitation. Lasers Surg. Med. 9999:1-8, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. tropicalis*; photodynamic therapy; turmeric

**INTRODUCTION**

In healthy individuals, *Candida* species are considered commensal yeasts of the oral cavity. *Candida albicans* represents the predominant species, while *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* are considered the second most frequent [1,2]. These microorganisms can also act as opportunist pathogens, being the so-called non-*albicans* *Candida* species increasingly recognized as important agents of human infection. Some predisposing factors can markedly increase the host's susceptibility to oral candidiasis, such as the use of ill-fitting dentures, AIDS and long-term antibiotic therapy [3-5]. For immunocompromised individuals, the disseminated forms of the disease can be a serious problem, often resulting in high mortality rates [6]. A number of surveys have documented increased rates of *C. glabrata* and *C. tropicalis* in systemic fungal infections [6-8]. *C. tropicalis* may be of particular concern in these cases because of its high pathogenicity in causing fungaemia [8].

Treatments available for *Candida* infection are typically drug based and can involve topical and systemic antifungal agents [4]. However, the use of standard antifungal therapies can be limited because of toxicity, low efficacy rates, and drug resistance [9]. In fact, the resistance of NAC to antifungals represents a major challenge for therapeutic and prophylactic strategies [6]. Some of these species, such as *C. glabrata*, are inherently less sensitive to fluconazole and other antimycotic drugs frequently used to combat fungal infections. In addition to the intrinsic resistance of some species, different clinical isolates belonging to a single species can vary widely in their susceptibility to antifungal agents [10]. This diversity could predispose the selection of more resistant strains and the persistence of the disease [10]. Moreover, most manifestations of candidiasis are associated with the formation of *Candida* biofilms on surfaces such as oral tissues, prostheses, and implanted devices [9]. Biofilms

Contract grant sponsor: Fundação de Amparo<sup>02</sup> à Pesquisa do Estado de São Paulo; Contract grant numbers: FAPESP 2008/03994-9, 2008/00601-6.

\*Corresponding to: Dr. Ana C. Pavarina, PhD, Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), Rua Humaitá, no. 1680, CEP: 14801-903, Araraquara, SP, Brazil.  
 E-mail: pavarina@foar.unesp.br

Accepted 5 July 2011  
 Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).  
 DOI 10.1002/lsm.21110




© 2011 Wiley-Liss, Inc.

### 8.3 Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa (Capítulo 2)



## 8 Anexo

## 8.4 Autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (Capítulo 3)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Araraquara	
FACULDADE DE ODONTOLOGIA		
Proc. CEEA nº 05/2008		
Araraquara, 02 de julho de 2008		
Senhores Pesquisadores:		
<p>O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 02/07/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Estudo in vivo da efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de <i>Candida albicans</i>. Avaliação de dois fotossensibilizadores" (Proc. CEEA nº 05/2008) <b>AUTORIZA</b> a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do <b>RELATÓRIO FINAL (JULHO/2011)</b></p>		
Atenciosamente.		
 <b>Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO</b> Coordenadora do CEEA		
À <b>Profª Drª ANA CLÁUDIA PAVARINA</b> a/c. Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa e Lívia Nordi Dovigo Pesquisador Responsável Nesta		
<small>Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA          Rua Humaitá nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP          5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: <a href="mailto:diretor@foar.unesp.br">diretor@foar.unesp.br</a> - home page: <a href="http://www.foar.unesp.br">http://www.foar.unesp.br</a></small>		

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

Araraquara, 28 de Julho de 2011.

**LÍVIA NORDI DOVIGO**