

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Cristiane Campos Costa Quishida

**Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos
fotossensibilizadores Photodithazine[®] e Curcumina, sobre
biofilmes multi-espécies formados por *Streptococcus mutans*,
Candida albicans e *Candida glabrata*.**

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 do título de Doutor em Reabilitação Oral.

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

ARARAQUARA
2013

Quishida, Cristiane Campos Costa

Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine® e Curcumina, sobre biofilmes multi-espécies formados por Streptococcus mutans, Candida albicans e Candida glabrata / Cristiane Campos Costa Quishida.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

153 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

1. Biofilmes 2. Fotoquimioterapia 3. Candida albicans 4. Candida glabrata 5. Streptococcus mutans 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

Cristiane Campos Costa Quishida

Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine[®] e Curcumina, sobre biofilme multi-espécies formado por *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

2º examinador: Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

3º examinador: Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva

4º examinador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

5º examinador: Profa. Dra. Eunice Teresinha Giampaolo

Araraquara, 25 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES

Cristiane Campos Costa Quishida

Nascimento	01 de dezembro de 1982
Filiação	Maurício Ramos Costa Dircelei Ferreira de Campos Costa
2003 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2007 – 2008	Estágio de docência na disciplina de Prótese Parcial Removível. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2007 – 2009	Curso de Mestrado, no programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2010 – 2012	Estágio de docência na disciplina de Prótese Parcial Removível. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2010 – 2011	Estágio de docência na disciplina de Prótese Total. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2009 – 2013	Curso de Doutorado, no programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Deus,

Obrigada por ser o Deus da minha vida, por me amar incondicionalmente, por guiar meus passos, por ser o meu o refúgio, a minha força e a minha alegria. Agradeço todas as oportunidades que tens colocado em meu caminho, por me capacitar a vencer cada desafio e por todos os sonhos que o Senhor tem permitido tornar-se realidade.

Ao meu marido e grande amor André,

Obrigada por me amar, por acreditar e sonhar comigo os meus sonhos, por ser o maior incentivador para que eu cursasse o Doutorado, por estar sempre ao meu lado, por ser meu companheiro de todas as horas, meu melhor amigo, pela paciência, lealdade, cumplicidade, por cuidar de mim, por fazer parte da minha vida e torna-la mais feliz. Meu amor, sem o seu apoio com certeza esta etapa da minha vida seria muito mais difícil.

Aos meus amados pais Maurício e Dircelei e ao meu irmão Leandro,

Agradeço a minha amada família por todo o apoio que sempre me deram, pelo incentivo para que eu sempre seguisse em frente, pelo carinho, compreensão, por sempre estarem ao meu lado torcendo e orando por mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Cláudia

Obrigada pela confiança depositada em mim, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade de ter cursado o Doutorado sob a sua orientação, por me estimular a superar minhas dificuldades e ter me proporcionado ensinamentos importantes para a minha formação como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Ewerton

Obrigada pelo exemplo de dedicação, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em me ajudar, pela paciência e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Érica, Raíssa, Júnior e Sarah

Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda que vocês me deram no desenvolvimento laboratorial deste trabalho. Obrigada por me ajudarem a fazer as soluções laboratoriais e verter as infindáveis placas de Chromagar e Mitis Salivarius, e principalmente pelos momentos agradáveis de convívio e amizade.

Aos meus amigos da turma de Doutorado

Aos amigos da turma de Doutorado em Reabilitação Oral (FOAr), **Ana Lúcia, Ana Paula, André, Antônio, Cadu, Camilinha, Carol, Flávia M, Fer Izumida, Juliano, Paty e Rodrigo**, por todos os momentos que estivemos juntos nesse período de Pós-graduação e pela amizade. Foi muito bom conhecer cada um de vocês.

Aos meus amigos de Laboratório de Microbiologia

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada, **Amanda, Bia, Chai, Camila Foggi, Camila Zamperini, Camilo, Cláudia, Ju Cabrini, Ju Delben, Du, Fer Izumida, Fer Alves, Kassia, Paula e Paty**, obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pela convivência agradável, amizade, pelas trocas de experiência e aprendizado que nos enriqueceram tanto. Conhecer e trabalhar como vocês foi um grande privilégio.

*Aos amigos, Ana Paula, Camilo, Fer Alves, Ju Cabrini, Livia Dovigo e
Mariana Andrade,*

Obrigada por podermos partilhar os conhecimentos e buscas por respostas no campo da Terapia Fotodinâmica e pelos momentos agradáveis de convivência no Laboratório.

Aos alunos de Iniciação Científica André, Pi e Bruna,

Muito obrigada pela oportunidade de aprendermos juntos, por confiarem em mim, pela dedicação e carinho. Vocês foram muito importantes na minha formação profissional.

*Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da FOAr -
UNESP,*

Obrigada por todos os ensinamentos e pela contribuição valiosa na minha formação Profissional.

*A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara -
UNESP*

Agradeço especialmente aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca, pela amizade, atenção, compreensão e pelos serviços prestados.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP,

Agradeço a FOAr, na pessoa da Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e Vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato pela estrutura, suporte e apoio para a realização deste projeto.

À Coordenação de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP,

Representada pela coordenadora Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina e pela Vice-coordenadora Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca pela oportunidade e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

À Capes e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Agradeço a **Capes** (período: 01/04/2010 a 31/08/2011) e a **FAPESP** (período: 01/09/2011 a 31/07/2013 - processo: 2011/09054-0) pelas concessões das bolsas de Doutorado para desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todas as pessoas que participaram e ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.



Quishida CCC. Estudo da eficácia da terapia fotodinâmica, mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine® e Curcumina, sobre biofilmes multi-espécies formados por *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP. 2013.

Resumo

A capacidade de aderência dos micro-organismos a diferentes superfícies, a resistência a medicamentos, bem como a interação entre as espécies visam garantir a sobrevivência e a proliferação dos mesmos, resultando em menor susceptibilidade dos patógenos aos tratamentos e aos procedimentos de desinfecção. Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a eficácia da Terapia Fotodinâmica (PDT) mediada pelos fotossensibilizadores (FSs) Photodithazine® (PDZ) e Curcumina (Cur) sobre biofilmes multi-espécies compostos por *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Para isso, o estudo foi dividido em três partes: 1- avaliação do efeito fotodinâmico das diferentes concentrações de PDZ (100, 150, 175, 200 e 250mg/L) associada à luz LED (660nm/ 37,5J/cm²) na inativação de biofilme multi-espécies formado em fundo de placa de 96 orifícios; 2- avaliação do efeito fotodinâmico quando realizadas uma e três aplicações sucessivas de PDT, mediada por PDZ (175 e 200mg/L) e luz LED (660nm/ 37,5J/cm²) na inativação de biofilmes multi-espécies, formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica. 3- avaliação do efeito fotodinâmico de diferentes concentrações do FS Cur (80, 100 e 120µM) associada à luz LED (455nm/ 37,5J/cm²) sobre biofilmes multi-espécies cultivados por diferentes períodos (24 e 48h) sobre corpos-de-prova de resina acrílica. Adicionalmente para cada condição avaliada foi verificado o efeito da aplicação isolada de cada concentração dos FSs PDZ e Cur em contato com o biofilme na ausência de luz (P+L-) e o efeito isolado da luz (P-L+). Além disso, foi realizado o grupo controle positivo, no qual o biofilme não esteve em contato com o FS e não foram iluminados com luz LED (P-L-). Após a aplicação dos tratamentos propostos, a viabilidade dos micro-organismos foi

avaliada por meio da contagem de colônias (UFC/mL), teste do XTT, determinação da biomassa total e microscopia confocal de varredura laser (MCVL). Os resultados obtidos foram analisados por meio de ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de Tukey ou Dunn, respectivamente. Para o biofilme formado em fundo de placa as concentrações de 175 e 200mg/L de PDZ mostraram maior redução na quantificação de colônias (UFC/mL) e no metabolismo celular (XTT), entretanto não foi verificada redução da biomassa total. Na segunda parte do estudo, três aplicações sucessivas de PDT mediada por PDZ nas concentrações de 175 e 200 mg/L foram mais efetivas quando comparadas a uma aplicação na redução de *S. mutans* (quantificação de colônias), além da redução no metabolismo celular e biomassa total do biofilme multi-espécie. Na terceira parte do estudo foi verificado que a redução da viabilidade celular (UFC/mL) ocorreu para as três espécies microbianas no biofilme formado por 24 horas sobre corpos-de-prova. No entanto no biofilme de 48h apenas a *C. glabrata* e *S. mutans* tiveram redução da viabilidade celular. Além, disso a PDT mediada por Cur foi eficaz para reduzir o metabolismo celular e a biomassa total dos biofilmes formados por 24 e 48 horas. Adicionalmente, para todas as condições experimentais avaliadas após a aplicação da PDT, mediada por PDZ ou Cur, foi verificada maior redução da bactéria do que das cepas de *Candida*. Além disso, as imagens obtidas por MCVL mostraram que após a PDT, mediada por PDZ ou Cur, houve aumento visual do número de células marcadas com fluorescência vermelha, quando comparado ao grupo controle (P-L-), indicando a ocorrência de dano celular pela aplicação dos tratamentos propostos. Desta forma, pode ser sugerido que a PDT é um tratamento promissor para infecções bucais, sendo eficaz na redução de bactérias e fungos quando organizados em biofilme multi-espécies.

Palavras Chaves: Biofilmes, Fotoquimioterapia, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Streptococcus mutans*.



Quishida CCC. Study of effectiveness of photodynamic therapy by Photodithazine® and Curcumin photosensitizer against multispecies biofilms formed by *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and *Candida glabrata*. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP. 2013.

Abstract

The ability of adhesion of microorganisms to different surfaces, the drug resistance, as well as the interaction among the species help to ensure the survival and proliferation of these microorganisms and result in lower susceptibility of these pathogens to treatment and disinfection procedures. This study aimed to evaluate the *in vitro* efficacy of PDT mediated by photosensitizers (FSs) Photodithazine® (PDZ) and Curcumin (Cur) against multispecies biofilms formed by *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Streptococcus mutans*. This study was divided into three parts: 1. evaluation of the effect of photodynamic therapy of different concentrations of PDZ (100, 150, 175, 200 and 250mg / L) associated with the LED light (660 nm / 37.5 J/cm²) in the inactivation of multispecies biofilms formed in 96-well microtiter plates; 2. evaluation of the photodynamic effect of one PDT applications only and three successive PDT applications mediated by PDZ (175 and 200 mg / L) and LED light (660 nm / 37.5 J/cm²) in the inactivation of multispecies biofilms, formed on acrylic resin samples; 3. evaluation of the photodynamic effect of different concentrations of Cur FS (80, 100, and 120µM) associated with LED light (455nm / 37.5 J/cm²) against multispecies biofilms grown during different periods (24 and 48h) on acrylic resin samples. Additional samples were treated either with FSs (PDZ or Cur) (P+L-) or LED light (P-L+) only. Positive control samples had neither light nor FSs (PDZ or Cur) (P-L-). After applying the proposed treatments, the viability of microorganisms was assessed by Colony Count (CFU / mL), the XTT assay, determination of the total biomass (CV) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results were analyzed using ANOVA or Kruskal-Wallis test followed by Tukey or Dunn, respectively. For the biofilm formed in 96-well plate, the concentrations of 175 and 200mg/L showed greater reduction in cell viability (CFU/mL) and cell metabolism (XTT), but a reduction in total biomass was not observed. In the second part of the

study, three successive applications of PDT mediated by PDZ concentrations of 175 and 200 mg/L showed higher microbial reduction of multispecies biofilm formed on acrylic resin samples than one application for all the proposed tests. In the third part of the study, it was found that the multispecies biofilm formed in 24 hours on acrylic resin sample was more sensitive to PDT than the 48 hours biofilm. After application of PDT mediated by PDZ or Cur, there was a greater reduction in bacteria than the *Candida* strains for all the test conditions mentioned. Furthermore, the images obtained by CLSM after PDT, mediated by PDZ or Cur, showed that there was an increase visual in the number of cells with red fluorescence when compared to the control group (P-L-), suggesting that there was cell damage through the application of these treatments. Thus, it can be suggested that PDT is a promising treatment for oral infections and is effective in reducing bacteria and fungi when associated in multispecies biofilm.

Key Words: Biofilms, Photochemotherapy, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Streptococcus mutans*.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
3 PROPOSIÇÃO	53
4 MATERIAL E MÉTODO	55
5 RESULTADOS	80
6 DISCUSSÃO	102
7 CONCLUSÃO	118
8 REFERENCIAS	121
9 APÊNDICE	131

An oval graphic with a light green background and a pattern of overlapping, semi-transparent geometric shapes (squares and rectangles) in a slightly darker shade of green. The word "Introdução" is written in a black, elegant cursive font across the center of the oval.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

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 orofaringe¹. Fatores etiológicos locais como redução do fluxo salivar, trauma local, alterações de pH e uso de próteses dentais podem estar associados ao desenvolvimento das infecções bucais por espécies de *Candida*^{6,38,53}. A colonização microbiana e a formação de biofilme nas superfícies das próteses dentais removíveis é um importante fator relacionado ao desenvolvimento de uma forma de candidose conhecida como estomatite protética²⁴. O biofilme aderido à superfície das próteses em uso contínuo pelo paciente caracteriza-se por ser uma comunidade complexa de micro-organismos, envolta em matriz de polissacarídeos, favorecendo a proliferação e a sobrevivência dos mesmos^{16,28,36,56}. O uso contínuo de próteses associado a uma higienização inadequada promove condições favoráveis para a proliferação de diversos micro-organismos^{6,68} e a ocorrência de infecções locais, como a estomatite protética que afeta normalmente o palato de aproximadamente 65% dos usuários de próteses¹². Estudos observaram alta prevalência dos micro-organismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* tanto na mucosa como na parte interna das próteses totais de pacientes^{4,58}. Além disso, tem sido relatado que os fungos do gênero *Candida* apresentam maior afinidade ao acrílico do que à mucosa do paciente^{43,46}. Também foi verificado que a presença de *S. mutans* em biofilme multi-espécies contendo *C. albicans* e *Candida glabrata* favoreceu o crescimento das duas espécies de *Candida* nas condições experimentais, sugerindo que pode ter ocorrido estímulo para o crescimento mútuo entre os micro-organismos e também a co-agregação, aumentando o processo de adesão⁵².

Apesar das terapias antifúngicas convencionais serem amplamente utilizadas no tratamento da estomatite protética, a infecção é, em alguns casos, recorrente, o que sugere que o biofilme pode servir como reservatório protetor para os micro-organismos⁹. Além disso, os micro-organismos utilizam diversos mecanismos para aumentar sua resistência aos agentes antimicrobianos e também aos procedimentos utilizados para a desinfecção das próteses, acarretando muitas

vezes no fracasso das terapias antifúngicas convencionais. Diante dessas dificuldades, a Terapia Fotodinâmica (PDT) tem sido sugerida como modalidade de tratamento para inativação microbiana, incluindo vírus, bactérias e fungos^{18,19,25,42,43,77}. O processo fotodinâmico requer a utilização de um composto químico denominado fotossensibilizador (FS) e a aplicação de luz em um comprimento de onda correspondente à banda de absorção do FS na presença de oxigênio^{18,19,25,42,43,77}. O FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies reativas^{2,33}. Tais espécies produzidas, em especial o oxigênio singlete, possuem reatividade não específica com moléculas orgânicas, de forma que qualquer macromolécula celular pode ser um alvo em potencial para PDT³³. 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.

De maneira geral os estudos têm relatado que a PDT promove completa fotoinativação dos micro-organismos quando os mesmos estão na forma planctônica^{3,18,19}, entretanto, quando esses estão organizados em biofilme tem sido observada apenas uma redução no número de micro-organismos^{3,18,19}. Outro aspecto importante relacionado à PDT é a possibilidade desta terapia ser capaz de desarticular a estrutura e diminuir a biomassa de biofilmes^{13,25}. Já foi demonstrado na literatura que a fotossensibilização letal dos micro-organismos submetidos a PDT ocorreram predominantemente nas camadas mais externas do biofilme⁵¹. Além disso, embora os biofilmes bacterianos não tenham sido completamente inativados pela PDT, esta ocasionou a remoção das camadas celulares mais externas dos biofilmes²⁵. Este mecanismo de ação sugere que a desestruturação do biofilme pela PDT pode torná-lo mais susceptível a futuras aplicações e permitir a penetração do FS nas camadas mais profundas potencializando a ação do tratamento. Além disso, de acordo com Ramage et al. (2001)⁵⁶ existe uma relação linear entre o aumento da densidade celular, decorrente do tempo de desenvolvimento do biofilme, e o aumento da atividade metabólica do biofilme. Adicionalmente, os autores observaram aumento da resistência de biofilmes maduros ao tratamento antifúngico convencional quando comparado às culturas planctônicas. Entretanto, não foram encontrados estudos que avaliassem efetividade da PDT em função de tempos de

formação do biofilme. Adicionalmente, a interação entre as diferentes espécies pode influenciar na eficácia da PDT. O estudo realizado por Pereira et al.⁵¹ (2011) avaliou o efeito da PDT mediada pelo FS azul de metileno e luz laser, na viabilidade de biofilmes formados por uma, duas e três espécies de micro-organismos, *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os autores observaram que a redução foi maior em biofilmes de única espécie (2,32 a 3,29 log₁₀) quando comparados a biofilmes multi-espécies (1,00 a 2,44 log₁₀). Assim, com o intuito de aumentar a eficácia da PDT contra biofilmes, a avaliação de outros FSs pode ser de grande importância.

O FS Curcumina (Cur) é um pigmento amarelo-alaranjado, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* L, também conhecida como açafrão-da-índia²⁰. Esta planta é originária do sudeste da Ásia, e tem sido tradicionalmente utilizada como tempero na culinária asiática e como medicamento natural na medicina chinesa²⁰. Vários trabalhos sugerem que a Cur possui efeitos antiinflamatórios, anticarcinogênicos, imunomoduladores e antimicrobianos^{40, 55, 61}, que poderiam ser exacerbados com a sua iluminação em comprimento de onda adequada^{7,34,69}. O estudo realizado por Dovigo et al.¹⁹ (2011) avaliou a efetividade da PDT mediada pelo FS Cur na inativação de solução planctônica e biofilme de *C. albicans*. Os resultados mostraram que, a associação do FS na concentração de 20µM e dose de luz de 5,28J/cm² foi efetiva para a inativação de solução planctônica, entretanto para a redução do metabolismo celular do biofilme de *C. albicans* houve a necessidade de FS na concentração de 40 µM para a mesma dose de luz, demonstrando menor susceptibilidade dos micro-organismos a PDT quando organizados em biofilme.

O FS Photodithazine[®] (PDZ) é uma clorina que também tem sido aplicada com sucesso na PDT contra o câncer, devido ao seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete¹⁵. De acordo com alguns estudos este composto tem mostrado maior eficiência fotodinâmica em relação às porfirinas e hematoporfirinas^{21,48}. O PDZ já mostrou sua eficiência fotodinâmica quando foi associado a uma luz visível para inativação de suspensões celulares de *C. albicans* e *Candida guilliermondii*⁶⁶. O mesmo composto foi avaliado em bactérias isoladas de bolsas periodontais de indivíduos com periodontite crônica e foi observado 75 e 80% de redução dos micro-organismos, quando suspensos em meio e PBS, respectivamente⁶⁵.

Contudo, a utilização desses compostos em PDT antimicrobiana ainda não foi muito investigada, e a sua efetividade na inviabilização de micro-organismos

presentes em biofilmes ainda precisa ser comprovada. Além disso, a avaliação do biofilme multi-espécies torna-se necessária, pois se assemelha a situações encontradas clinicamente, uma vez que os fungos e bactérias presentes na cavidade oral estão organizados em biofilme. Assim, julga-se importante avaliar a capacidade da PDT antimicrobiana mediada pelos fotossensibilizadores Photodithazine® (PDZ) e Curcumina na inativação de biofilmes multi-espécies, formado por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão do assunto, a revisão da literatura foi organizada em duas partes: na primeira parte, foram relatados os estudos a respeito das considerações sobre a formação do biofilme; na segunda parte foram abordados estudos relacionados à Terapia Fotodinâmica.

2.1 Formação do Biofilme

A habilidade das espécies de *Candida* aderir a superfícies poliméricas inertes pode ser a porta de entrada direta dos micro-organismos no hospedeiro humano. Desta forma, Klotz et al.³² (1985) avaliaram a aderência de *Candida spp* em superfícies plásticas sob duas perspectivas: (1) ação das características da superfície do fungo na adesão; e (2) ação das características da superfície na adesão. A aderência à superfície foi testada sobre amostras de poli(tetrafluoretileno), poli(etilenotereftalato), poli(metilmecacrilato) e superfície de poliestireno de placa de petri. As caracterizações biofísicas mostraram que as forças responsáveis pela adesão desses fungos a superfícies são as forças de Van der Waals (ou forças hidrofóbicas) e as forças eletrostáticas. A afinidade hidrofóbica das leveduras foi determinada pelo ensaio bifásico água-hidrocarboneto e pela medição do ângulo de contato (Θ) de uma gota de líquido sobre uma monocamada de células de levedura. A aderência das leveduras nos polímeros com aumentada hidrofobicidade foi diretamente proporcional ao ângulo de contato. Quando as cargas superficiais de levedura foram alteradas seletivamente bloqueando os grupos amino e carbóxilo, as leveduras carregadas mais positivamente aderiram em maior número. Aumentando a molaridade de NaCl, houve aumento da aderência das leveduras. Assim, os autores encontraram uma relação linear entre o número de células aderidas por unidade de área e o ângulo de contato do substrato, ou seja, quanto mais hidrofóbica a superfície, maior a aderência celular por unidade de área.

Sabendo-se que o biofilme da prótese é um fator contribuidor para a etiologia da estomatite protética, Verran et al.⁷¹ em 1987 avaliaram a aderência do

Streptococcus spp e a subsequente adesão de *Candida albicans* ao acrílico. Suspensões de *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus salivarius* foram cultivadas sobre amostra de polimetilmetacrilato. A aderência de *S. sanguis* e *S. salivarius* em acrílico foi medido após 1 h de incubação a 37 °C. Após este período eles foram lavados cuidadosamente, em seguida foram colocados sobre estas amostras alíquotas de suspensão de *C. albicans*. E estes micro-organismos foram incubados novamente por 1 h a 37°C. Após a incubação as amostra foram lavadas, secas e fixadas. As células aderidas ao acrílico foram então coradas com oxalato de cristal violeta. A porcentagem do campo microscópico coberto por células foi mensurada por um sistema de análise de imagem por computador. O exame visual das amostras de acrílico mostrou que as células de *Candida* aderiram às espécies de *Streptococcus*, mas não diretamente ao acrílico. Além disso, foi verificada a correlação positiva e significativa entre a porcentagem de *Streptococcus* e o número de leveduras aderidas por campo microscópico. Assim, o aumento do número de *Streptococcus* aderentes aumentou a superfície para a adesão de *Candida*.

Branting et al.⁵, em 1989, também estudaram se a adesão de *Candida albicans* ao acrílico poderia ser mediada pela interação célula a célula com o *Streptococcus mutans*. Foi observado que o *S. mutans* se aderiu firmemente na presença de sacarose, enquanto que a *C. albicans* foi apenas fracamente ligada ao acrílico nos meios de sacarose e glicose. A microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura mostram que a firme adesão de *C. albicans* ao acrílico ocorreu quando a levedura foi incubada simultaneamente com o *S. mutans*, na presença de sacarose, contudo, nenhuma co-agregação foi observada na presença de glicose.

Pacientes que receberam transplante de medula óssea frequentemente apresentam proliferação de espécies de *Candida* na orofaringe durante o período de imunossupressão. Assim, o estudo de Hsu et al.²⁹, (1990) caracterizaram fungos orais e bactérias obtidas de pacientes imunossuprimidos que receberam transplantes de medula óssea (TMO) e a co-agregação entre isolados clínicos de espécies de *Candida* e bactérias orais. Para o teste de co-agregação, foram utilizados: isolados de *Candida* de pacientes que tiveram TMO, obtidos de amostras salivares, *C. albicans* (ATCC 18804), isolado de *C. albicans* obtida de sangue de paciente imunossuprimido, *Candida tropicalis* isolada de sangue de paciente imunossuprimido, e *C. albicans* obtida a partir da saliva de paciente

imunossuprimido, obtido do Centro de Câncer da Universidade de Maryland. As cepas de bactéria isoladas da saliva do pacientes com TMO foram associadas às seguintes cepas padrão de bactérias: *Lactobacillus salivarius* (ATCC 11741), *L. acidophilus* (ATCC 521), *L. casei* (ATCC 11578), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *S. salivarius* (ATCC 25975), *S. sanguis* (ATCC 10556), *S. sanguis* (ATCC 10557), *S. sanguis* (ATCC 903), *S. mutans* (ATCC 1600), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 13833), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Actinomyces viscosus* (ATCC 15987), *Bacteroides gingivalis* (CS213) isolado de bolsa periodontal de paciente na Universidade de odontologia de Maryland, e *Fusobacterium nucleatum* (VPI 10197). As cepas padrão de bactérias foram selecionadas para representar as espécies orais que reconhecidamente habitam a cavidade bucal de pacientes imunossuprimidos. Foi observado que cada cepa de *Candida* mostrou um padrão diferente de co-agregação com as 22 bactérias estudadas. Duas linhagens de *Lactobacillus amylovorus* isoladas de pacientes com TMO e *Fusobacterium nucleatum* co-agregaram com as cepas de *Candida*. Dez cepas bacterianas não mostraram co-agregação com as cepas de *Candida*. Além disso, foi observado uma variedade de padrões de inibição quando as cepas co-agregadas foram primeiramente incubadas com vários tipos de açúcares ou submetidas a tratamento térmico. Assim baseado nas características das espécies, foram sugeridas relações entre a colonização e a co-agregação de bactérias e leveduras.

Além disso, Chau et al.¹¹, em 1995 demonstraram que as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumonia* α -hemolítico foram capazes de penetrar as resinas acrílicas Luccitone 199 (termopolimerizada), resina ortodôntica e resina autopolimerizável, após 24 horas de incubação. Após a incubação com as bactérias as resinas foram colocadas em três diferentes soluções desinfetantes (Biocide, Alcide e hipoclorito de sódio) de acordo com a indicação dos fabricantes. O único desinfetante que foi eficaz para a inativação microbiana foi a solução de hipoclorito de sódio a 0,525% (imersão por 10 minutos). A desinfecção ocorreu não apenas na superfície da resina, mas também foi efetiva para as bactérias que penetraram até 3 mm de profundidade na resina acrílica.

A adesão dos micro-organismos à superfície é um pré-requisito para formação de biofilme. Tem sido sugerido que a prótese funciona como um

reservatório de micro-organismos e que as irregularidades da superfície podem aumentar a adesão microbiana. Desta forma, Verran et al.⁷⁰, em 1997 avaliaram o efeito da rugosidade de superfícies na retenção de *C. albicans*. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova de polimetilmetacrilato (PMMA) e silicone com diferentes rugosidades e estas amostras foram contaminadas com suspensões fúngicas de *C. albicans* padronizadas ($1,29 \times 10^7$ células/mL). Após o período de adesão (1 hora/ 24°C), os corpos-de-prova contaminados foram lavados, fixados com metanol e corados por laranja de acridina. A contagem das células aderidas foi realizada em microscopia de fluorescência por meio da contagem de 10 campos e obtenção da média de células aderidas por unidade de área. Os autores observaram maior número de células nas superfícies rugosas quando comparadas às superfícies lisas do PMMA. Além disso, quando compararam as superfícies rugosas PMMA e do silicone, houve maior aderência ao silicone. Os autores concluíram que o aumento na rugosidade de superfície, seja nas superfícies de resina acrílica ou silicone, facilitou a retenção fúngica.

Uma variedade de constituintes e produtos, dentre eles os extrapolissacarídeos (EPS), podem estar relacionados ao processo de aderência e formação do biofilme. Skillman et al.⁶³ (1999) investigaram o envolvimento dos extrapolissacarídeos (EPS) nos eventos de adesão e no desenvolvimento do biofilme mono e duo-espécies formado pelas bactérias *Enterobacter Agglomerans* e *Klebsiella pneumoniae*. Uma vez que ambas as cepas pertencem à espécie *Enterobacteriaceae*, foi necessário identificar uma das cepas para que fosse possível fazer a identificação delas quando estivessem juntas no biofilme misto. Isto foi conseguido através da marcação da bactéria *Ent. agglomerans* com um plasmídeo verde fluorescente, a partir deste momento esta bactéria foi denominada EntGFP. Esta marcação permitiu a avaliação do biofilme por visualização direta (iluminação UV), microscopia e mensuração quantitativa de fluorescência. Além disso, uma enzima bacteriofágica específica para *Ent. Agglomerans* foi inserida para degradar o EPS desta bactéria no biofilme misto com o objetivo de avaliar a importância do EPS no biofilme. A avaliação microscópica mostrou que as duas espécies apresentaram por inúmeras vezes íntima justaposição microbiana, sugerindo que as interações envolvem macromoléculas associadas à superfície. Também foi observado que as células de EntGFP e *K. pneumoniae* interagiram formando biofilmes com mais sucesso quando estavam associadas do que quando

estavam isoladas. O exame da fluorescência mostrou que a bactéria transformada por plasmídeo EntGFP teve melhor aderência ao EPS da *K. pneumoniae* do que ao EPS da *Ent. Agglomerans*. O teste de introdução da enzima bacteriófágica no biofilme mostrou que após o contato com essa enzima a adesão de EntGFP as células *K. pneumoniae* foi reduzida. Isto sugere que ambos os tipos de EPS sejam mediadores da adesão. Além disso, a enzima bacteriófágica utilizada nos biofilmes duo-espécies resultou na remoção eficaz de ambas as espécies da superfície, podendo ser sugerido que o EPS EntGFP apresenta maior contribuição para a formação da matriz do biofilme.

Sabendo-se que as propriedades superficiais dos materiais dentários podem afetar o acúmulo de placa e coloração das próteses, Zissis et al.⁷⁹ (2000) investigaram in vitro a rugosidade de 20 materiais dentários comercialmente disponíveis, sendo, quatro resinas de base de prótese, nove reembasadores rígidos e sete reembasadores macios. Foram realizadas medições da rugosidade utilizando o aparelho rugosímetro Mitutoyo SurfTest SV-400, e os valores de rugosidade (Ra) obtidos foram utilizados para as comparações. A resina para base de prótese exibiu valores de Ra 3,4 - 7,6 μ m, enquanto que os reembasadores rígidos apresentaram valores de 0,7 - 4,4 μ m. Os reembasadores macios autopolimerizáveis e fotopolimerizáveis apresentaram valores de Ra 0,7 - 3,5 μ m, enquanto os reembasadores macios polimerizados por calor variou 3,5-4,0 μ m. A aspereza exibida por todos os materiais testados (Ra valores superiores a 0,7 μ m) indicam maior possibilidade de acúmulo da placa, enquanto é esperado que valores abaixo de 0,2 μ m não haja aderência microbiana.

O biofilme fornece aos micro-organismos um local protegido da ação de tratamentos e assim favorece uma fonte de infecção persistente. Desta forma, Chandra et al.⁹, em 2001, avaliaram o desenvolvimento dos biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans* (cepas GDH-2346 e M-61) sobre amostras de polimetilmetacrilato e silicone elastomérico. A partir das espécies de *Candida* foi demonstrada que a formação dos biofilmes acontece em três fases de desenvolvimento distintas. Essas fases de crescimento transformam blastósporos aderentes à superfície em comunidades celulares bem definidas envoltas em matriz de polissacarídeo. A microscopia de fluorescência e a microscopia confocal de varredura laser mostraram que os biofilmes de *C. albicans* apresentaram arquitetura altamente heterogênea, composto de elementos celulares e não celulares (matriz de

polissacarídeos). Em ambos os modelos, a resistência fúngica de células cultivadas aumentou com o processo de formação do biofilme. A expressão de genes de aglutinina, que codificam uma família de proteínas envolvidas na adesão às superfícies, foi regulada diferencialmente entre células planctônicas e os biofilmes formados. Além disso, a formação de biofilme de *C. albicans* foi comparada a cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Observou-se que a capacidade de *C. albicans* para formar biofilmes é marcadamente diferente de *S. cerevisiae*. Este último é capaz de aderir às superfícies das biopróteses, mas não consegue progredir para a formação de biofilme maduro, caracterizado pela presença da matriz extracelular. Além disso, foi verificado que a resistência fúngica do *S. cerevisiae* não aumentou com o tempo.

Ainda no mesmo ano, Chandra et al.¹⁰ (2001), desenvolveram um modelo reprodutível de biofilme de *C. albicans* em prótese e utilizaram este modelo de biofilme para determinar a susceptibilidade de dois isolados de *C. albicans* clinicamente relevantes a quatro antifúngicos. Os biofilmes de *C. albicans* tiveram 50% de redução na atividade metabólica quando submetidos aos antifúngicos Anfotericina B, Nistatina, Clorexidina e Fluconazol, quando estes estavam nas concentrações de 8, 16, 128 e > 64 g/mL, respectivamente. A análise das suspensões planctônicas de *C. albicans* mostrou que estas também foram sensíveis a estes antifúngicos, apresentando redução de 50% do metabolismo celular, porém em concentrações menores 0,25, 1,0, 4,0, e 0,5 g /mL de Anfotericina B, Nistatina, Clorexidina e Fluconazol, respectivamente. Assim os autores concluíram que os biofilmes de *C. albicans* são mais resistentes aos antifúngicos quando comparado às suspensões planctônicas.

Sabendo que uma variedade de infecções por *Candida* estão relacionadas à formação de biofilmes em superfícies de biomateriais, Ramage et al.⁵⁶ (2001) descreveu as características do desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* utilizando o modelo de biofilme realizado em placa de microtitulação de 96 orifícios. A análise do biofilme foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), e por meio do ensaio colorimétrico do XTT para monitorar a atividade metabólica do biofilme. A formação do biofilme de *C. albicans* foi caracterizada pela aderência inicial de células de levedura (0-2 h), seguido de germinação e a formação de micro-colônia (2-4 h), formação de filamentos (4-6 h), desenvolvimento de monocamada (6-8 h), proliferação (8-24 h) e maturação (24-48 h). O ensaio de redução de XTT revelou

uma relação linear entre a densidade celular do biofilme e a atividade metabólica. O pré-condicionamento com saliva aumentou a fixação inicial de *C. albicans*, mas teve um efeito mínimo sobre a formação do biofilme. A MEV e a MCVL mostraram que o biofilme maduro de *C. albicans* foi constituído por uma rede densa de células de leveduras e hifas, envoltos por um material extrapolimérico. Além disso, o biofilme de *C. albicans* apresentou uma complexa estrutura tridimensional demonstrada pela heterogeneidade espacial e uma arquitetura mostrando microcolônias com ramificações de canais de água. O teste de susceptibilidade antifúngica demonstrou o aumento da resistência dos biofilmes de *C. albicans* ao fluconazol e a Anfotericina B, em comparação aos os seus homólogos planctônicos.

No mesmo ano Waltimo et al.⁷² avaliaram *in vitro* a aderência de quatro cepas de *Candida* a superfícies com diferentes hidrofobicidade. Foram utilizados os polímeros recém-polimerizados para base de prótese e após armazenamento em água. Para a realização do estudo foram confeccionadas trinta e duas amostras de resina autopolimerizável para base de prótese que foram armazenadas em água destilada a 37°C por 7 dias e 32 amostras de resina recém-polimerizadas. Dezesesseis amostras de cada grupo foram tratadas previamente com a saliva não estimulada, e 16 foram pré-tratados com solução tamponada com fosfato (PBS) a 37 °C durante 1 hora. A hidrofobicidade das superfícies das amostras recém-polimerizadas e das amostras armazenadas em água foi determinada pela medida do ângulo de contato. As cepas de *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram cultivadas em meio tripitona de soja. Cada cepa foi pré-tratada com 1 mL saliva ou PBS e suspensas em PBS, e em seguida padronizadas a 10^8 células/mL. Além disso, quatro amostras de resina foram incubadas sem agitação, com cada suspensão de levedura a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram lavadas com PBS, e deixadas secar ao ar. As células aderentes foram fixadas com metanol e realizou-se a coloração do Gram, em seguida cada espécie foi contada em dez campos de microscopia de luz de alta potência. A maior aderência de leveduras foi observada em amostras armazenadas em água, em comparação com as amostras recém-polimerizadas. A presença da película salivar reduziu a hidrofobicidade das amostras e a aderência de leveduras. Não foram observadas diferenças nos ângulos de contato de água destilada entre polímeros recém-polimerizados e armazenados em água. Os autores concluíram que as leveduras parecem aderir menos à resina recém-polimerizada do

que a resina armazenada em água. Isto pode ser devido à liberação de monômeros residuais a partir do material recém-polimerizado.

Em 2004, Lamfon et al.³⁶ avaliaram *in vitro* a susceptibilidade de biofilmes de *C. albicans* de diferentes idades aos agentes antifúngicos e antimicrobiano (Clorexidina, Fluconazol e Miconazol). Os biofilmes de *C. albicans* foram cultivados sobre amostras de resina acrílica para prótese a 37°C e mantidos com a saliva artificial. O MIC de fluconazol, miconazol e clorexidina para *C. albicans* foi determinado. Após a determinação do MIC para cada cepa referente aos antifúngicos e o antimicrobiano, os biofilmes de diferentes idades (2-72 h) foram expostos às concentrações obtidas com o MIC por dois períodos diferentes. Os resultados mostraram que o biofilme de *C. albicans* foi altamente resistente ao fluconazol e miconazol quando comparado com a suspensão de *Candida*. Em contraste, a clorexidina inibiu o crescimento do biofilme *C. albicans* numa concentração de até 8 x a concentração do MIC. A investigação da susceptibilidade do biofilme ao longo do tempo mostrou maiores reduções para a aplicação da clorexidina e miconazol do que para o fluconazol nos biofilmes de 2 e 6 h, entretanto não houve redução significativa para os biofilmes de 48 ou 72 horas. Neste estudo foi demonstrado que a susceptibilidade de *C. albicans* aos antifúngicos e antimicrobianos são alterados ao longo do desenvolvimento do biofilme.

Perezous et al.⁵³ (2005) realizou uma revisão da literatura sobre a colonização por espécies de *Candida* em pacientes imunocomprometidos usuários de prótese total. Os autores relataram a necessidade de reconhecer indivíduos com maior risco de desenvolver candidose oral de modo que as intervenções possam ser planejadas a fim de reduzir a frequência desta infecção, além da utilização de medidas preventivas de higiene bucal no controle da infecção. Também foi discutida a relação dos materiais para base de prótese e seu efeito sobre o crescimento dos fungos, apontando que as irregularidades da superfície da resina acrílica podem ser um fator que propicia a retenção de micro-organismos nas próteses.

Em 2008, o estudo realizado por Khot et al.³¹ avaliaram a correlação entre o ensaio de XTT e a contagem de unidade formadoras de colônia (UFC/mL) após o tratamento com Anfotericina B (Anf B). Os autores verificaram que a diferença nas estimativas de células viáveis com base em UFC/mL em comparação ao ensaio metabólico do XTT originou uma alteração na taxa de crescimento de células danificadas pela exposição da Anf B, porém, que ainda foram capazes de formar

colônias. Os micro-organismos expostos a Anf B que ainda foram capazes de formar colônias, apresentaram grande variedade de tamanhos, enquanto que as células não tratadas produziram colônias com uma distribuição de tamanho relativamente semelhante. Na maioria das avaliações baseadas em ensaios de metabolismo, as células com um crescimento mais lento e/ou menores taxas metabólicas contribuíram proporcionalmente menos para uma estimativa global da viabilidade. Em contraste, as células que produzem colônias contribuem igualmente para a estimativa de viabilidade baseados em UFC independentemente do tamanho da colônia.

Como forma de desinfecção de prótese e controle microbiológico, Neppelenbroek et al.⁴⁶, em 2008 avaliaram a eficácia da desinfecção por microondas de próteses totais superiores no tratamento de estomatite relacionada a *Candida*. Sessenta pacientes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 15 indivíduos cada. No grupo controle os pacientes realizaram o cuidado de rotina com a prótese; no grupo microondas (Mw), as prótese superiores dos pacientes foram submetidas ao tratamento em micro-ondas (650 W por 6 min), três vezes por semana durante 30 dias; no grupo Micro-ondas/miconazol (MwMz), as próteses superiores foram submetidas ao tratamento em micro-ondas e os pacientes foram orientados a realizar aplicação tópica de miconazol três vezes por dia durante 30 dias; no grupo miconazol (Mz), os pacientes receberam a terapia antifúngica com miconazol (aplicação tópica três vezes por dia por 30 dias). O esfregaço citológico e culturas micológicas foram retirados da prótese e do palato de todos os pacientes antes do tratamento, no 15° e 30° dia de tratamento e no período de acompanhamento (60 e 90 dias). A análise microbiológica e clínica do grupo controle não mostrou redução significativa na infecção por *Candida* durante no ensaio clínico. Esfregaços e culturas palatinas das próteses dos grupos Mw e MwMz apresentaram ausência de *Candida* em 15 dias e 30 de tratamento. Nos dias 60 e 90 de acompanhamento, algumas formas de micélio foram observados em 11 esfregaços da prótese (36,6%) para os grupos Mw e MwMz, mas não foram encontradas nos esfregaços palatinos. O grupo Mz não promoveu redução significativa da inflamação palatal, nem a erradicação de *Candida* das próteses e do palato. O tratamento das próteses por micro-ondas foi eficaz no tratamento da estomatite protética, e a recorrência de *Candida* em próteses submetidas a este tratamento no período de acompanhamento foi drasticamente reduzida.

No estudo realizado por Peeters et al.⁵⁰ (2008) foram comparados vários métodos para a quantificação microbiana. Para a quantificação do biofilme formado em placas de microtitulação de 96 orifícios foram utilizados os ensaios de cristal violeta (CV), ensaio de Syto-9, ensaio de diacetato de fluoresceína (FDA), ensaio de resazurina, ensaio de XTT e o ensaio de azul de metileno de dimetilo (DMMB). Para a formação dos biofilmes analisados foram utilizados os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *S.aureus*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*. Em geral, estes ensaios mostraram uma aplicabilidade ampla e uma elevada reprodutibilidade para a maioria dos isolados. Além disso, a estimativa do número de UFC/mL dos biofilmes mostraram baixas variações entre os diferentes ensaios. Adicionalmente a maioria dos ensaios foram considerados simples, rápidos e perfeitamente adequados para a quantificação dos biofilmes. No entanto, o teste de XTT foi considerado caro, e de acordo com os autores não mostrou valores que acrescentassem na quantificação celular quando comparado aos ensaios de resazurina e FDA. O teste de CV apesar de ser considerado barato, simples e comumente utilizado na quantificação de diversos biofilmes não se mostrou reprodutível para as cepas de *P. aeruginosa* testadas, além de não permitir diferenciar células vivas e mortas. Para esta aplicação específica, os testes de FDA, resazurina e Syto-9 foram considerados mais apropriados.

Em 2008, Pereira-Cenci et al.⁵² investigaram as interações entre *Candida albicans* e *Candida glabrata* ou *Streptococcus mutans* em biofilmes cultivados na superfície de Hidroxiapatita (HA), polimetilmetacrilato (PMMA) e reembasador macio para a prótese (SL), na presença ou ausência de saliva. A análise quantitativa dos micro-organismos foi realizada por contagem de colônias viáveis (UFC/mL). A microscopia confocal de varredura laser (MCVL) foi utilizada para caracterizar os biofilmes e quantificar o número de hifas em cada condição experimental. Para os biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* a contagem de colônias foi significativamente maior para os materiais HA, seguido de PMMA e SL, independente do tipo de açúcar ou do biofilme formado (mono ou duo-espécie). Também foi observada que a contagem de colônias de *C. glabrata* foi maior do que a contagem de *C. albicans* para as condições experimentais, exceto quando este biofilme foi cultivado sobre amostras revestidas por saliva. Além disso, foi verificado que a glicose e a presença de *S. mutans* suprimiram a formação de hifas de *C. albicans*. As duas espécies de *Candida* não apresentaram interação competitiva entre si. Os autores concluíram

que o biofilme de *Candida* é significativamente afetado pela saliva, pelo tipo de substrato e pela presença de outros micro-organismos.

As espécies de *Candida* são capazes de formar biofilmes em quase todos os dispositivos médicos. A facilidade de formação do biofilme em diferentes superfícies é um importante fator para a virulência dos micro-organismos. Neste contexto, Seneviratne et al.⁶⁰ (2009) avaliaram a cinética de crescimento, arquitetura e viabilidade de biofilmes de cepas padrão (ATCC) e um isolado clínico de *C. albicans* e de *C. glabrata*. Para esta análise foram utilizados os métodos de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), ensaio colorimétrico do XTT, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura laser (MCVL) pela utilização do kit Live/Dead BacLight. As imagens obtidas por MCVL foram analisadas pelo software COMSTAT. A cinética de crescimento do biofilme sobre um substrato de poliestireno foi avaliada a partir da etapa de adesão (1,5 h) até 72 h. De acordo com a análise de UFC/mL, na fase de adesão, a capacidade de adesão ao substrato foi dependente da espécie. Em geral a maior adesão foi obtida para os isolados clínicos. Também foi observado aumento do número de células no biofilme até 48 horas, a partir desse momento foi observado declínio do crescimento. Desta forma, o biofilme de 72 horas apresentou menores valores de contagem de células do que no biofilme de 48 horas. O ensaio do XTT mostrou que a *C. glabrata* exibiu maiores valores de absorbância quando comparada a *C. albicans*. Além disso, para todas as espécies foram observados valores relativamente altos de absorbância na fase de adesão atingindo pico máximo em 48 horas, seguido de declínio. As imagens de MCVL analisadas pelo software COMSTAT confirmaram as fases de crescimento do biofilme verificadas nos outros testes deste estudo. A análise estrutural do biofilme por MEV mostrou características espécie-específicas. Em geral todas as espécies aderiram à superfície de poliestireno na fase de adesão (90 minutos) e posterior desenvolvimento do biofilme até 48 horas, e a partir de 72 horas foi verificado desintegração do biofilme. Além disso, verificou-se que *C. albicans* formou biofilmes espessos, com organização espacial complexa compreendida por blastoporos, pseudohifas e hifas envoltas por matrix extracelular. *C. glabrata*, desenvolveu biofilmes mais finos e compactos apresentando apenas blastósporos incorporados as matriz extracelular. Essas análises revelaram diferenças inter e intra-espécies importantes na organização temporal do biofilme de *Candida* quanto à arquitetura, organização espacial e

viabilidade celular, quando atingiram a maturidade no período de 48 h sobre o substrato de poliestireno.

Silva et al.⁶² (2009) teve como objetivo caracterizar os biofilmes produzidos por 18 isolados clínicos de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A capacidade de formação de biofilme dos isolados clínicos dessas espécies foi avaliada por coloração com cristal violeta. As características da estrutura dos biofilmes e morfológicas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e a composição de matriz do biofilme foi analisada pela composição de proteína e de hidratos de carbono. Todas as espécies *Candida* foram capazes de formar biofilmes, embora a *C. glabrata* tenha produzido biofilme menos robusto comparado a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Foi evidente que a produção de biofilme de *C. parapsilosis* foi altamente dependente da cepa, uma característica não observada nas espécies de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A MEV revelou diferenças estruturais dos biofilmes em relação à morfologia celular e arranjo espacial. As matrizes dos biofilmes de *C. parapsilosis* apresentaram grandes quantidades de hidratos de carbono e menor quantidade de proteína, enquanto que as matrizes dos biofilmes de *C. tropicalis* apresentavam baixas quantidades de hidratos de carbono e proteínas. A matriz do biofilme de *C. glabrata* apresentou elevada quantidade de proteínas e carboidratos. O presente trabalho demonstrou que a capacidade de formação do biofilme, a estrutura e a composição da matriz são altamente dependentes da espécie, exceto para a espécie *C. parapsilosis*, na qual foi observadas variações dependentes das cepas utilizadas.

Pathak et al.⁴⁹, em 2012, avaliou a diferença da capacidade de formação de biofilme mono-espécie ou a combinação delas em biofilmes multi-espécies. Para isto foram utilizados vinte e quatro isolados clínicos, sendo seis cepas referentes para cada uma das espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*. Os micro-organismos foram cultivados em caldo de Sabouraud dextrose com 8% de glucose. A produção de biofilme sobre as amostras de resina acrílica foi determinada por ensaio de cristal violeta (CV). Para este modelo experimental, as espécies de *Candida* apresentaram diferentes comportamentos quanto à capacidade de formação de biofilme mono-espécies, apresentando a seguinte ordem quanto à produção de biofilme: *C. glabrata* > *C. krusei* > *C. tropicalis* > *C. albicans*. De acordo com os autores a maior formação de biofilme verificada para *C. glabrata* pode estar relacionada ao método de análise empregado (CV), uma vez

que *C. glabrata* apresenta elevada quantidade de proteínas e hidratos de carbono que pode ter favorecido a maior absorção do corante. A análise das combinações das espécies nos biofilmes multi-espécies mostrou que a maior produção de biofilme foi obtida pela combinação de *C. albicans* e *C. glabrata*. Além disso, foi relatado que a presença de *C. albicans* nos biofilmes multi-espécies foi responsável por aumentar a produção de biofilme, enquanto que a *C. tropicalis* diminuiu a produção de biofilme quando associada a todas as outras espécies de *Candida* não albicans.

2.2 Terapia Fotodinâmica

No ano de 1987, Tonnesen et al.⁶⁹ avaliaram a fototoxicidade da Cur nas suspensões celulares de cepas de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Nessas suspensões celulares foram adicionadas diferentes concentrações de Cur diluídas em DMSO (5% para *E. coli* e 10% para *S. typhimurium*). As soluções de Cur ficaram em contato com os micro-organismos por um período de 30 minutos (tempo pré-iluminação) para permitir a entrada do composto nas células, em seguida as suspensões foram iluminadas. A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio da contagem de colônias (UFC/mL). Amostras adicionais de suspensões microbianas foram tratadas com a maior concentração da Cur, na ausência de iluminação. Para testar a toxicidade dos produtos de degradação da Cur, após a iluminação, as soluções foram incubadas no escuro por 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Os resultados mostraram que a fototoxicidade da Cur associada à luz sobre as suspensões foram concentração dependente. Para determinar os efeitos tóxicos dos produtos formados durante o processo de iluminação das soluções de Cur, a mesma foi individualmente iluminada e, após a iluminação por 30 minutos, as soluções foram colocadas em contato com as suspensões celulares por 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Os resultados mostraram que a viabilidade da *S. typhimurium* não foi afetada pela adição de Cur previamente iluminada, o que mostra que a fototoxicidade é causada por produtos intermediários instáveis. Para determinar se a Cur induzia danos ao DNA, foram utilizadas duas cepas diferentes de *Escherichia coli* com deficiência nos mecanismos de reparo do DNA e/ou com habilidade ou inabilidade para fermentar a lactose (Lac+ e Lac-). Os resultados mostraram que houve danos genotóxicos somente para as cepas Lac+. A atividade da Cur foi dependente do tempo de iluminação e da concentração.

Zeina et al.⁷⁸, (2001) investigou a ação fotodinâmica do azul de metileno e luz visível na suspensões celulares de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *C. albicans*. A fotossensibilização das amostras foi realizada na concentração 100 mg/L do corante azul de metileno. A iluminação das amostras foi realizada por um projetor de slides como fonte de luz policromática, nas intensidades de luz que variaram de 1,6 a 42 mW/cm². As suspensões foram submetidas a iluminação por períodos de 10 a 60 minutos. Para análise da efetividade do tempo de iluminação, a cada 10 minutos de exposição à luz, uma alíquota foi diluída e plaqueada em meio de cultura específico. Foram obtidos “valores-D”, referentes ao tempo mínimo de exposição necessário para promover redução na contagem de colônias viáveis. Foi mostrado que os valores-D obtidos diferiram para cada micro-organismo, sendo que a *C. albicans* mostrou o maior valor em comparação com as bactérias (a iluminação por 660 segundos reduziu apenas 0,09 log ufc/mL). Os autores atribuíram este resultado ao fato de que as células da *C. albicans* apresentam tamanho/volume cerca de 25-50 vezes maior do que as células das bactérias testadas. Adicionalmente, a presença da membrana nuclear nos fungos, pode representar uma barreira para a penetração do FS, tornando a *C. albicans* mais resistente a PDT.

O'Neill et al.⁴⁷ (2002) avaliaram a fotossensibilização letal de biofilme multi-espécies de bactérias orais. Os micro-organismos obtidos da saliva de dez indivíduos saudáveis foram colocados sobre membranas filtrantes em nitrato de celulose para a formação do biofilme. Após a formação dos biofilmes por 24 horas, estes foram expostos ao azul de orto-toluidina (TBO) e iluminados com laser. Foram verificados também os efeitos isolados da luz e TBO. Os biofilmes foram avaliados pela contagem de colônias e examinados por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Além disso, foi realizada a identificação dos micro-organismos coletados presentes na saliva. As imagens de MCVL mostraram que os biofilmes apresentavam estruturas semelhantes aos do biofilme formado sobre os elementos dentários. Além disso, foi verificado que 97,4% dos micro-organismos foram mortos após iluminação com luz laser a 31,5 J e densidade de energia de 81,9J/cm², na presença de 25 µg/mL de TBO. Os métodos de identificação das espécies mostram que os biofilmes obtidos foram constituídos de 32,8% *Streptococci*, 6,5 % *Veillonella spp.*, 0.1% *Actinomyces spp.*, e 0.1% bactérias anaeróbicas Gram negativas. Os autores concluíram que um número substancial de bactérias orais dos biofilmes

multi-espécies foram eliminados por meio da PDT, sendo um indicativo que este tratamento poderia ser útil para resolução de doenças relacionadas ao biofilme dentário.

Strackhovskaya et al.⁶⁶, em 2002, avaliaram a eficácia dos fotossensibilizadores photodithazine (PDZ) e sal de glucosamina de clorina e6 associado a luz visível na inativação de *C. guilliermondii*. Para isso, uma suspensão celular de *C. guilliermondii* (2×10^7 células/mL) foi incubada com os fotossensibilizadores, e em seguida foi iluminada com dose de luz de 50W/cm². Após a PDT, alíquotas da suspensão microbiana foram transferidas para um eletrodo de oxigênio Clark-type para a mensuração dos níveis de consumo de oxigênio. Além disso, foram realizadas contagem de células viáveis (UFC/mL). Os resultados mostraram que apenas 37% de *C. guilliermondii* sobreviveram na presença de 2 µM de clorina e6, e que a eficiência de fotossensibilização do PDZ foi 25 vezes maior para a mesma concentração utilizada de clorina e6. Este fato pode estar relacionado a melhor solubilidade do PDZ em água, reduzindo a agregação das moléculas de PDZ em soluções aquosas. Além disso, com o aumento da concentração de Photodithazine para 20 mM, sua eficiência de fotossensibilização aumentou mais de 25 vezes. Desta forma o PDZ mostrou-se um fotossensibilizador promissor com alta atividade antifúngica.

Soukos et al.⁶⁴ (2003), avaliaram os efeitos fotodinâmicos do conjugado entre o fotossensibilizador (FS) clorina e6 (ce6) e uma poly-L-lysine (pL) com 5 resíduos de lisina sobre o biofilme bucal, assim como no biofilme de *Actinomyces naeslundii*. Foram coletadas amostras de placa subgengival de 12 pacientes com periodontite crônica e essas foram divididas em três grupos (cada grupo foi constituído de 4 amostras). Grupo 1: suspensão celular incubada por 5 minutos com 5 mM de Ce6 equivalentes ao conjugado pL-Ce6, na presença de meio de cultura; grupo 2: adição de PBS a suspensão celular; grupo 3: adição de 80% de PBS e 20% de EDTA a suspensão. Em seguida as amostras foram expostas à luz vermelha (15 J/cm²). Além disso, os biofilmes de *A. naeslundii*, formados em superfície de esmalte bovino, foram expostos as ondas fotomecânicas por 15 minutos com 5µM do conjugado pL-ce6 e em seguida foram iluminados com a luz vermelha. A profundidade de penetração do conjugado foi medida por microscopia confocal de varredura laser (MCVL). Em ambos os casos, após a iluminação foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 100µL foram colocadas em placas com meio de

cultura Agar sangue. De acordo com os resultados obtidos, o grupo submetido a terapia fotodinâmica (PDT) apresentou 90% de morte dos micro-organismos. Em biofilmes de *A. naeslundii* a MCVL mostrou que as ondas fotomecânicas foram suficientes para induzir um aumento de 50% da profundidade da penetração pL-CE6 conjugado no biofilme. Isso permitiu que a sua destruição (99% de morte) após a PDT. Os autores concluíram que as ondas fotomecânicas associadas a PDT podem ser um instrumento com grande potencial para o tratamento de doença periodontal crônica.

Chabrier-Roselló et al.⁸, em 2008, investigaram a influência da PDT associada ao FS Photofrin[®] sobre a espécie de *C. albicans*. Tubos germinativos e biofilmes de 24 horas de *C. albicans* foram incubados com Photofrin[®] 10 mg/L durante 1 e 5 minutos e, em seguida, iluminados com uma lâmpada de mercúrio com dose de luz de 15 mW/cm². O grupo controle foi constituído por amostras incubadas no escuro e não expostas a luz. A atividade metabólica fúngica foi avaliada pelo ensaio de XTT. Para avaliar a captação do Photofrin[®] pela célula, tubos germinativos de *C. albicans* foram analisados em microscopia de fluorescência. Com a finalidade de avaliar a resposta adaptativa do micro-organismo à injúria oxidativa, tubos germinativos foram submetidos repetidas vezes a tratamentos com H₂O₂ (primeiramente a uma concentração subletal de 1 mM e, posteriormente, em concentrações tóxicas que variaram de 50 a 100 mM), PDT (iniciando com o Photofrin[®] numa concentração subtóxica de 0,5 mg/L associada à iluminação de 9 J/cm², seguida por novas iluminações com concentrações do FS entre 1 e 10 mg/L) ou associação de ambos os tratamentos. Adicionalmente, biofilmes submetidos à PDT (10 mg/L de Photofrin[®], incubados por 30 minutos e iluminados com 18 J/cm²) foram comparados com biofilmes tratados com anfotericina B 10 mg/L. Os resultados das amostras de tubo germinativo mostraram que ambos os tempos de incubação de 1 e 5 minutos com o FS promoveram a completa eliminação da atividade metabólica de *C. albicans*. As imagens obtidas pela microscopia de fluorescência revelaram captura uniforme de FS pelos micro-organismos após 5 minutos de incubação. Foi observada resistência na resposta adaptativa da *C. albicans* tratada várias vezes com H₂O₂. Porém, não houve resistência quando amostras foram submetidas a repetidas PDTs ou quando esta foi associada ao tratamento com H₂O₂. Com relação ao biofilme, a iluminação das amostras sensibilizadas pelo Photofrin[®] promoveu redução significativa da atividade

metabólica de *C. albicans*. Além disso, a diminuição da atividade metabólica da célula fúngica submetida à PDT foi maior em relação às aquelas tratadas com anfotericina B.

Demidova, Hamblin¹⁷ (2005) compararam a efetividade da PDT na inativação de suspensões das bactérias *Escherichia coli* (gram-negativo) e *S. aureus* (gram-positivo), e do fungo *C. albicans*. A fotoinativação foi testada com a utilização dos fotossensibilizadores rosa bengala (RB), azul de toluidina (TBO) e uma clorina (e6) de poli-lisina conjugado (pL-ce6), em diferentes concentrações, associados a uma fonte de luz não coerente. As suspensões celulares foram incubadas em ambiente escuro com os FSs em diferentes concentrações durante 20 minutos, e em seguida, alíquotas de 200 µL foram transferidas para uma placa de 96 orifícios, e iluminadas com doses de luz de 0 a 200 J/cm². As amostras foram iluminadas com e sem a remoção do excesso do agente FS. Para a análise microbiana foi realizada a contagem de colônias (UFC/mL). Adicionalmente, após a incubação, alíquotas foram utilizadas para verificar se os FSs permaneciam ligados à membrana celular ou se houve captação para o interior da célula. Os resultados mostraram que quanto maior a concentração celular da suspensão maior concentração necessária do FS para a inativação dos micro-organismos. Dos FSs avaliados, o pL-ce6 foi mais efetivo para a inativação das bactérias e do fungo. *C. albicans* mostrou maior resistência a PDT quando comparada às bactérias. Os resultados foram justificados pelo fato da célula fúngica possuir tamanho 10 a 50 vezes maior que a célula bacteriana necessitando de uma maior quantidade de oxigênio singlete para sua inativação e por possuir membrana nuclear, que pode funcionar como uma barreira a penetração do FS.

Ainda em 2005, Sharma et al.⁶¹ realizaram uma revisão da literatura a respeito das propriedades da Cur. Foi verificado que a Cur age como potente doadora de átomos de hidrogênio em pH ácido, por outro lado, em pH acima de 8, atua como doadora de elétrons, eliminando a atividade antioxidante. Essa substância é praticamente insolúvel em água, entretanto dissolve em acetona, dimetilsulfoxide (DMSO) e etanol. Os autores ainda enfatizam que a Cur exibe baixa biodisponibilidade sistêmica após ingestão oral. Apesar disso, a obtenção de altos níveis de Cur no trato gastrointestinal, particularmente no cólo e reto, tem sido demonstrada em animais e humanos. Além disso, os autores sugerem que a Cur induz efeitos sistêmicos relevantes na quimioprevenção do câncer em tecidos mamários e hepáticos. Foi relatado que a Cur é capaz de inibir a proliferação celular

e induzir apoptose de fungos e vírus. Os mecanismos responsáveis pela indução da apoptose são variados: instabilidade da p53, liberação de citocromo-C e geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a Cur age como anti-inflamatório e antioxidante.

No estudo realizado por Zanin et al.⁷⁷ (2005) foi avaliado o efeito da associação do azul de orto-toluidina (TBO) na concentração de 100 mg/L a luz LED vermelha ou ao laser de He-Ne sobre biofilmes de *S. mutans* formado em um fermentador de fluxo contínuo (FFC). A utilização do FFC possibilitou a simulação da formação do biofilme, a partir de culturas de *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita (HA), em local constantemente banhado por saliva artificial. Os discos de HA contendo os biofilmes foram removidos do FFC após 3, 7 e 10 dias e o TBO foi adicionado sobre o biofilme e deixado no escuro por 5 min. Após este período, os biofilmes foram expostos por 5, 15 e 30 minutos ao laser He-Ne ou a luz do LED, na potência de 32 mW para ambos os aparelhos, correspondente as dose de luz de 49, 147 and 294 J/cm². Foi verificada redução significativa nas contagens de colônias bacterianas após a aplicação da PDT. Não foram observadas diferenças significativas no efeito antimicrobiano promovido quando o laser de He-Ne ou a luz LED foram utilizados. Além disso, a microscopia confocal demonstrou que a inativação das bactérias promovida pela PDT ocorreu predominantemente nas camadas externas dos biofilmes e que os biofilmes mais velhos foram menos susceptíveis a essa terapia.

O estudo de Hope, Wilson²⁷, em 2006, teve por objetivo induzir a fotossensibilização letal em biofilmes de *Streptococcus pyogenes*, utilizando o microscópio confocal de varredura laser para a fotoativação de Sn (IV) de clorina e6 (SnCe6) e ao mesmo tempo medir as mudanças na vitalidade das células utilizando indicadores fluorescentes de integridade da membrana. Desta forma, os biofilmes de *S. pyogenes* foram imersos numa solução de 50 mg/L de SnCe6 e irradiados com os lasers de argon (488 nm) e HeNe (543 nm) no microscópio confocal. As mudanças na permeabilidade da membrana foram quantificadas utilizando ferramentas de análise de imagem. Os resultados mostraram que a permeabilidade celular aumentou nos biofilmes de *S. pyogenes* após a iluminação sucessiva e ciclos de exposição na presença de SnCe6. Os autores concluíram que a associação do FS SnCe6 e as emissões do laser do microscópio confocal de varredura laser foram eficientes para induzir a morte celular em biofilmes de *S. pyogenes*.

Ainda no mesmo ano, Jori et al.³⁰ realizaram uma revisão de literatura baseada nos princípios de ação e aplicações da PDT na inativação microbiológica. Segundo os autores devido ao surgimento de doenças infecciosas resistentes aos tratamentos convencionais, muitos estudos têm buscado alternativas terapêuticas para a inativação de micro-organismos patogênicos. A PDT oferece muitas vantagens para o tratamento de infecções microbianas, tais como um amplo espectro de ação, a inativação de micro-organismos resistentes e o baixo potencial mutagênico nas células expostas. A PDT tem se mostrado capaz de promover atividades fototóxicas contra uma grande variedade de bactérias, fungos e protozoários. No entanto, a fotoinativação de fungos parece ser mais difícil de ser atingida, devido ao maior tamanho celular desses micro-organismos, que exige uma maior quantidade de oxigênio singlete para que a inativação celular ocorra, em comparação com bactérias. Particularmente no caso da candidose, a aplicação tópica de FS associada a luz para a inativação microbiológica parece oferecer um importante avanço para o tratamento de pacientes imunocomprometidos, como no caso dos pacientes HIV positivos. A utilização de porfirinas tem se mostrado efetiva para a fotossensibilização de *C. albicans*, e tem promovido inativação do fungo após a iluminação com luz visível. A PDT também representa uma modalidade terapêutica potencialmente aplicável para o tratamento de doenças periodontais e cáries.

O objetivo do estudo realizado por Koon, et al.³⁴ (2006) foi avaliar o efeito fotodinâmico da Cur na linhagem de células de carcinoma de nasofaringe NPC/CNE2. A citotoxicidade e fotototoxicidade da Cur foram avaliadas pelos ensaios do MTT. Além disso, foram averiguados a cinética de absorção de Cur pelas células NPC/CNE2 por citometria de fluxo, e o tipo de indução da morte celular, por microscopia de fluorescência. Os resultados deste estudo mostraram que a Cur na ausência de luz foi citotóxica, contudo, a citotoxicidade do Cur foi aumentada pela iluminação com luz visível e a luz azul filtrada, nas doses de luz de 300 kJ/m² e 60 kJ/m², respectivamente. Foi verificado que as células NPC/CNE2 absorveram rapidamente a CUR na primeira hora de incubação, e a cinética de absorção aumentou até 20 horas de incubação e a partir desse período foi alcançado um patamar no nível de absorção. Na microscopia de fluorescência foi observado encolhimento celular e ruptura da membrana. Tais evidências provaram que a Cur pode induzir apoptose em células NPC/CNE2. Os autores concluíram que a Cur

pode ser utilizada como um fotossensibilizador potencial, bem como um agente quimioterapêutico em aplicações clínicas.

Garcez et al.²² em 2007, compararam a eficácia da terapia fotodinâmica (PDT) ao tratamento endodôntico convencional e a combinação da PDT ao tratamento convencional para eliminar os biofilmes de bactérias presentes em canais radiculares infectados. Para isto, foram utilizados dez dentes unirradiculares humanos recém-extraídos, nos quais foram inoculados bactérias Gram-negativas bioluminescentes estáveis, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e foram formados biofilmes de 3 dias nos canais radiculares preparados. As imagens de bioluminescência foram utilizadas para quantificar as bactérias. A PDT foi mediada por um conjugado de polietilenimina e clorina (e6) como o fotossensibilizador (FS) e associada ao laser diodo (660 nm) emitido no canal da raiz por meio de uma fibra. Os resultados do estudo mostraram que a realização do tratamento endodôntico reduziu a bioluminescência bacteriana em 90%, enquanto que o tratamento com PDT reduziu a bioluminescência em 95%. Entretanto, a combinação de tratamento convencional e PDT promoveu a redução > 98% na bioluminescência. Além disso, foi observado que após 24 horas a regeneração de bactérias quando realizada a combinação dos tratamentos foi muito menor ($P < 0,0005$) do que quando os tratamentos foram realizados isoladamente.

De acordo com a revisão realizada por Konopka et al.³³ (2007) a Terapia Fotodinâmica, envolve o uso de um corante fotoativo (fotossensibilizador) que é ativado pela exposição à luz com um comprimento de onda específico, na presença de oxigênio. A transferência de energia da fonte de luz para o fotossensibilizador resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, tais como o oxigênio singlete e os radicais livres, que são espécies químicas altamente reativas capazes de danificar alvos inespecíficos como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. Aplicações da PDT em odontologia estão crescendo rapidamente, uma vez que tem mostrado potencial para o tratamento de leucoplasia oral, líquen plano, e câncer de cabeça e pescoço. Além disso, tem sido utilizada como terapia para infecções bacterianas e fúngicas, parasitárias e virais. A PDT também representa uma nova abordagem terapêutica no tratamento de biofilmes orais, pois o rompimento da estrutura do biofilme tem consequências importantes para a homeostase do biofilme. Adicionalmente a ausência de efeitos genotóxicos e mutagênicos da PDT é um fator importante para a segurança em longo prazo

durante o tratamento. A cavidade oral é particularmente adequada para a aplicação da PDT, porque apresenta fácil acesso para a iluminação.

Müller et al.⁴⁴ (2007) avaliaram o efeito antimicrobiano do gás ozônio e terapia fotodinâmica (PDT) *in vitro* sobre os biofilmes orais maduros de *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium necleatum*, *Streptococcus sobrinus*, *S. oralis* e *C. albicans*. Essas espécies foram tratadas de acordo com os seguintes grupos: (1) aplicação de 60s de vácuo por forma gasosa de ozônio ou de vácuo isoladamente (amostras de biofilme molhadas ou seco ao ar); (2) aplicação da PDT mediada por azul de metileno, combinado ou não ao laser de diodo e aplicação do laser de iodo isoladamente; ou (3) soluções antimicrobianas: imersão de biofilmes por 60 s em clorexidina a 0,2 e 2% ou na solução de hipoclorito a 0,5 e 5%. Os tratamentos com hipoclorito e clorexidina foram utilizados como controle positivo, ao passo que as amostras não tratadas serviram como controles negativos. As unidades formadoras de colônias foram contadas em meio de cultura específico. Apenas o hipoclorito a 5% foi capaz de eliminar totalmente os micro-organismos do biofilme. A contagens de células viáveis para aplicação de vácuo de ozônio e PDT mostrou redução inferior a 1 log₁₀. Sob as condições deste estudo, o ozônio na forma de gás e a PDT apresentaram efeito mínimo sobre a viabilidade dos micro-organismos organizados em modelo de biofilme cariogênico.

Lulic et al.³⁷ (2009) verificaram a adição de efeito benéfico ou não da PDT no tratamento convencional de bolsas periodontais de pacientes em manutenção. Dez pacientes de manutenção com 70 bolsas residuais (Profundidade de Sondagem (PPD) > ou = 5 mm) foram aleatoriamente designados para cinco sessões de aplicação de PDT no período de duas semanas (dias 0, 1, 2, 7, 14) após o tratamento periodontal convencional. O grupo controle foi composto por indivíduos que receberam apenas o tratamento periodontal convencional. A principal variável analisada foi a profundidade de sondagem, seguida do nível clínico de inserção (CAL) e sangramento a sondagem (BoP). Estas variáveis foram avaliadas nos períodos de 3, 6 e 12 meses após as intervenções. Após o período de seis meses foram obtidas as maiores reduções de PPD e CAL para ao grupo PDT em comparação aos pacientes de controle. A porcentagem de BoP diminuiu significativamente no grupo PDT em relação ao controle de pacientes após 3, 6 e 12 meses. Os autores concluíram que as aplicações repetidas de PDT, por cinco vezes,

como adjuvante do tratamento periodontal convencional promoveu melhores resultados clínicos em bolsas residuais em pacientes de manutenção.

No mesmo ano, Martins et al.⁴⁰ avaliaram a atividade antifúngica da Cur contra 23 cepas fúngicas de interesse clínico, assim como na sua habilidade de inibir a adesão de *Candida spp.* às células epiteliais humanas (CEH). Assim, análises *in vitro* da suscetibilidade das cepas foram procedidas usando Cur (0,5 – 256 mg/L) e fluconazol (0,06 – 64 mg/L) como controle positivo. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram encontradas, e os resultados mostraram que a Cur foi até 32 vezes mais potente que o fluconazol na completa inibição de uma cepa de *Paracoccidioides brasiliensis* e que 32 mg/L de Cur foi capaz de causar completa inativação de 2 isolados clínicos de *Candida dubliniensis*. Além disso, foram realizados testes de adesão, expondo *Candida* à MIC de Cur por 1 h e, em seguida, incubando por mais 1 h com CEH. Os resultados mostraram que a Cur foi capaz de inibir a adesão de espécies de *Candida* às CEH e, os 2 isolados clínicos de *C. dubliniensis* (Cd22 e Cd28) foram os que tiveram maior redução na capacidade de adesão (63 e 74%, respectivamente). A partir dos resultados obtidos, os autores puderam concluir que a Cur teve maior atividade antifúngica sobre o crescimento celular e foi mais eficiente na inibição da adesão às CEH que o fluconazol.

Em 2009, Priyadarsini⁵⁵ revisou na literatura as propriedades físico-químicas, a influência dos solventes e do pH nas propriedades fotofísicas do estado excitado da Cur e da sua degradação e fototoxicidade. A Cur apresenta propriedades farmacológicas sendo muito utilizada com finalidade terapêutica na medicina indiana e chinesa. Dentre as atividades farmacológicas são encontradas a ação anti-inflamatória, antitumoral, para tratamento de doenças neurológicas, cardiovasculares e doenças de pele. A Cur apresenta também, propriedades fototóxicas contra sistemas bacterianos. Com relação à solubilidade e estabilidade da Cur, foi encontrado que a Cur é praticamente insolúvel em água em pH 7, sendo, entretanto, solúvel em diversos solventes orgânicos, como metanol, etanol, DMF, DMSO, clorfórmio, acetomitrila, dentre outros. Com relação ao espectro de fluorescência, a máxima fluorescência é dependente da natureza do solvente, variando com a constante dielétrica e índice de refração. Em DMSO, a fluorescência máxima varia entre 535 e 560 nm. A Cur mostrou-se estável em pH baixo em soluções aquosas alcoólicas, mas sofre degradação química e hidrólise em pH básico. Em solventes orgânicos, a Cur sofre fotólise sob a luz UV e forma 3 produtos de degradação. Os

autores relataram, ainda, que a Cur tem ação fototóxica, já bastante reportada, contra sistemas bacterianos e células de mamíferos. A fototoxicidade é dependente do oxigênio, e bactérias gram-negativas foram mais resistentes a PDT que as gram-positivas. O papel da Cur na atividade fotobiológica mediada pelo oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) é controversa, visto que alguns estudos mostram a formação dessas EROs, enquanto outros afirmaram que é captadora de $^1\text{O}_2$. A Cur apresenta vários alvos moleculares. Por ser uma molécula lipofílica, ela interage, primeiro, com a membrana celular e as proteínas de ligação da membrana e, então, é distribuída para diferentes partes da célula.

De acordo com Collins et al.¹³ (2010) a fotoativação de porfirinas resulta na produção de oxigênio singleto que danificam biomoléculas como as proteínas, polissacarídeos, e DNA de células microbianas. Assim, o efeito da porfirina catiônica sobre os biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1 e *P. aeruginosa* pqsA mutantes foram avaliados pela exposição dos biofilmes estáticos ao FS 5,10,15,20-tetraquis-(1-metilpiridino)-21H, 23H-Porphine, tetra-p-tosilato de sal (TMP) e em seguida foi realizada a iluminação com lâmpada de mercúrio no comprimento de onda de 400 nm e dose de luz de $240\text{J}/\text{cm}^2$. Os biofilmes foram visualizados utilizando-se Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) e viabilidade celular determinada por meio do kit BacLight Live/Dead e Contagem de Colônias. A concentração de $100\ \mu\text{M}$ de TMP, promoveu substancial morte de *P. aeruginosa* PAO1 do tipo selvagem e pqsA mutantes, com pouco rompimento da matriz ou estrutura do biofilme. A exposição a $225\ \mu\text{M}$ de TMP resultou na morte quase completa, assim como o destacamento do biofilme de tipo selvagem PAO1. Por outro lado, os biofilmes de pqsA mutante que contêm menos DNA extracelular permaneceram intactos. A contagem de células mostrou redução de $4,1\ \log_{10}$ para PAO1 do tipo selvagem e $3,9\ \log_{10}$ para cepa pqsA mutante. Os autores sugeriram que a ação da TMP fotoativado em biofilmes de *P. aeruginosa* foi duplo: morte direta de células individuais dentro de biofilmes e descolamento do biofilme do substrato.

De acordo com Epstein et al.²⁰ (2010) a Cur é amplamente utilizada como tempero de cozinha e corante alimentar em toda a Índia, na Ásia e no mundo ocidental. Além disso, a Cur tem sido utilizada na medicina tradicional asiática e Africana para o tratamento de uma ampla variedade de doenças. Recentemente tem surgido um forte interesse por remédios à base de plantas. A Curcumina é não-tóxica para os seres humanos em doses elevadas. É uma molécula complexa com

múltiplos alvos biológicos e diferentes efeitos celulares. Atualmente, seus mecanismos moleculares de ação têm sido amplamente investigados, e possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticâncer. Dessa forma a Cur é uma promessa como um agente modificador da doença e quimiopreventivo.

Goulart et al.²⁵ (2010) avaliaram a terapia fotodinâmica (PDT) mediada pelo (FS) Rosa Bengala (RB), em culturas planctônicas e biofilme de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactéria responsável por causar a periodontite agressiva. As culturas planctônicas e biofilme de *A. actinomycetemcomitans* foram submetidos as concentrações de 0,01-50,0 µM/L de RB, com diferentes potências de luz e tempos de incubação. Para a emissão de luz foi utilizado um fotopolimerizador de resina odontológica, uma vez que este emite o comprimento de onda adequado para a absorção do FS RB. A viabilidade bacteriana foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Para a PDT mediada por RB a 0,1µM/L e iluminação de 1 minuto houve redução de 55% da viabilidade da cultura planctônica de *A. actinomycetemcomitans*. A redução do biofilme (cerca de 45%) foi significativamente dependente da concentração RB e tempo de iluminação. De acordo com os autores a PDT gerou espécies reativas de oxigênio. Além disso, pequenas concentrações do agente FS foram capazes por inativar o micro-organismo tanto em culturas planctônicas quanto em biofilme.

Em 2011, Dovigo et al.¹⁸ realizaram um estudo para avaliar a PDT mediada por Cur sobre isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, na forma planctônica e em biofilme. As suspensões de *Candida spp* foram tratadas com três concentrações Cur e expostas a quatro doses de luz (5,28, 18, 25,5 e 37,5 J/cm²). O protocolo que apresentou os melhores resultados para a inativação da fase planctônica foi selecionado para ser avaliado sobre os biofilmes de *Candida*. A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada por meio do ensaio de redução de XTT, e a biomassa do biofilme foi avaliada pela utilização do corante cristal violeta (CV). O uso da Cur em associação com a luz foi capaz de promover um efeito significativo antifúngico nas formas planctônicas das leveduras. Quando foi utilizada a concentração de 40 µM de Cur associada 18J/cm², a atividade metabólica de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* em biofilmes reduziu 85%, 85% e 73%, respectivamente. A PDT mediada pela Cur também reduziu a biomassa do biofilme de todas as espécies estudadas. Por meio dos resultados, os autores concluíram

que baixas concentrações de Cur associadas à iluminação podem ser altamente eficazes na inativação de isolados de *Candida spp.*

Ainda no mesmo ano, Dovigo et al.¹⁹ avaliaram a efetividade da Cur associada a luz LED na inativação de *C. albicans*. As suspensões de *C. albicans* foram tratadas com nove concentrações de Cur e expostas a luz LED sob diferentes doses de luz. O protocolo que apresentou os melhores resultados para a inativação de *C. albicans* foi selecionado para avaliar: o efeito do tempo de pré-iluminação (TPI) da Cur, a eficácia da absorção de Cur por células de *C. albicans* e o possível envolvimento do oxigênio singlete. Além disso, também foi verificada a efetividade da PDT mediada pela Cur sobre o biofilme de *C. albicans*. Adicionalmente aos experimentos microbiológicos foi analisado o efeito da PDT sobre uma linhagem celular de macrófagos por meio do ensaio do MTT e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Quando comparado com o grupo controle, uma redução estatisticamente significativa foi observada na viabilidade de *C. albicans* após a PDT ($P < 0,05$), para as culturas planctônicas e de biofilme. Para as suspensões planctônicas foi observada inativação completa da *C. albicans* quando a Cur na concentração de 20 μ M foi mantida em contato com o micro-organismo por 20 minutos (TIP) e em seguida foi associado a dose de luz de 37,5J/cm². Para o biofilme a maior redução no metabolismo celular (87,22%) foi obtida quando a Cur foi utilizada na concentração de 40 μ M foi mantida em contato com a *C. albicans* por 20 minutos (TIP) e em seguida foi iluminada com LED na dose de luz de 37,5J/cm². As imagens de MEV mostram redução do número de células aderidas às lamínulas de vidro após a PDT quando comparado ao grupo controle. A PDT foi considerada fototóxica para os macrófagos, entretanto a PDT foi mais eficaz na inativação da célula de levedura do que para as células de defesa.

O estudo *in vitro* realizado por Mima et al.⁴² (2011) avaliou a eficácia da PDT na inativação de diferentes espécies de *Candida* em próteses totais superiores. Trinta e quatro próteses foram fabricadas de forma padronizada e submetidas ao óxido de etileno para a esterilização. As cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* foram inoculadas individualmente sobre as próteses. Após a formação do biofilme por 24 h, as próteses foram submetidas a PDT (P+L+) mediada pelo FS Photogem (50mg/L). Para isto o FS foi borrifado na superfície das próteses e estas foram incubadas por 30 minutos. Após este período as próteses foram iluminadas com luz LED (37,5 J/cm²). Adicionalmente foram

avaliados os efeitos do FS na ausência de luz (P+L-), o efeito isolado da luz (P-L+) e ausência da luz e FS (P-L-). Os resultados mostraram que para todas as espécies de *Candida*, a PDT reduziu significativamente as unidades formadoras de colônias quando comparado com o grupo controle (P-L-). Foram observadas reduções de 3,99 log₁₀ para *C. tropicalis*, 2,67 log₁₀ para *C. krusei*, 2,29 log₁₀ para *C. albicans*, 2,17 para *C. glabrata* e 1,73 para *C. dubliniensis*. Também foram observadas diferenças significativas para a *C. albicans* quando submetida apenas ao FS na ausência de iluminação (P+L-) e para as cepas de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* quando submetidas apenas a luz LED (P-L+) quando comparadas com o grupo P-L-. Contudo, estas reduções foram inferiores as encontradas para os grupos PDT. De acordo com os autores, a PDT resultou na redução significativa da viabilidade de diferentes espécies de *Candida* obtidas das próteses, sendo sugerido que a PDT pode ser utilizada como tratamento adjuvante a estomatite protética.

Pereira et al.⁵¹, em 2011 avaliaram os efeitos da PDT mediada por azul de metileno (MB) e iluminação com laser de baixa potência na viabilidade de biofilmes mono, duo e de três espécies formados por *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*. Os biofilmes foram cultivados em discos de resina acrílica imersos em meio BHI contendo 5% de sacarose, inoculados com suspensão microbiana (10⁶ células/mL) e incubados por 5 dias. No quinto dia, foram avaliados os efeitos do FS MB na concentração de 0,1 mg /mL por 5 min de incubação e iluminação com laser de AlGaInP (660 nm) durante 98 s. Para quantificação microbiana foi realizado o teste de contagem de colônias (UFC/mL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram observadas reduções significativas na viabilidade de todos os micro-organismos expostos à PDT mediada pelo FS MB. Entretanto, as maiores reduções (log₁₀) foram obtidas para os biofilmes mono-espécies (2,32-3,29) quando comparado aos biofilmes mistos (1,00-2,44). As imagens obtidas por MEV sugeriram que a fotossensibilização letal ocorreu predominantemente nas camadas mais externas dos biofilmes, devido a dificuldade do FS se difundir na estrutura do biofilme. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que os biofilmes formados por *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*, quando isolados ou associados, foram sensíveis a PDT mediada por MB.

Garcia-Gomes et al.²³ (2012) avaliaram a capacidade da Cur na sensibilização de um isolado clínico de *C. albicans*, com alta resistência ao fluconazol. Além disso, foi avaliado se a resistência desse isolado era resultado da existência de bombas de efluxo, que podem conferir um fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Para avaliar a interação sinérgica de Cur e Fluconazol, os experimentos foram realizados pela técnica do tabuleiro. Nesta técnica suspensões microbianas foram colocadas em placas de 96 orifícios contendo meio de cultura na presença ou ausência de diferentes concentrações de fluconazol e Cur isoladamente ou na combinação deles. Os ensaios de Nile red e Rodamina 6G foram utilizados para avaliar a atividade da bomba de efluxo. Foi mostrado neste estudo que a Cur quando utilizada na concentração de 11µM apresentou a capacidade de reduzir 80% do crescimento celular quando combinado a 4mg/L de fluconazol. Baseados no índice da fração inibitória (FICI) foi observado um evidente sinergismo entre a Cur e o fluconazol. A análise com diferentes azóis e dos dois corantes indicaram que a bomba de efluxo pode atuar contribuindo com a resistência deste isolado de *C. albicans* ao Fluconazol.

O estudo conduzido por Mang et al.³⁹ (2012) avaliou a capacidade da PDT mediada pelo FS Photofrin® na inativação de isolados resistentes de *Candida*. Para isso foram utilizadas suspensões planctônicas de cepas ATCC de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, assim como isolados resistentes e sensíveis ao fluconazol e anfotericina B provenientes de indivíduos com AIDS. Os micro-organismos foram tratados com 25 µg/mL de Photofrin® e iluminados por laser (630 nm), a uma dose de 45 a 135 J/cm². Para determinar a viabilidade, foi feita a contagem do número de colônias viáveis. Todas as cepas apresentaram uma significativa redução da viabilidade após tratamento com PDT, em todas as doses de luz avaliadas. Os isolados de pacientes com AIDS que apresentavam resistência fúngica mostraram susceptibilidade à PDT equivalente à cepas ATCC controles da mesma espécie. Os autores concluíram que a PDT mediada pelo Photofrin® foi eficaz na inativação de espécies de *Candida*. Os isolados de *Candida* de pacientes com AIDS que eram resistentes a fluconazol ou anfotericina B foram igualmente susceptíveis à PDT.

Mima et al.⁴³ (2012) avaliaram a eficácia clínica e micológica da PDT comparado com o tratamento antifúngico tópico para estomatite protética (EP), além disso, foi realizada a identificação das espécies de *Candida* mais prevalentes. Para

a realização do estudo, os pacientes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n = 20 cada); no grupo nistatina (NYT) os pacientes receberam tratamento tópico com nistatina (100.000 UI) quatro vezes por dia durante 15 dias, e no grupo PDT a prótese e o palato dos pacientes foram borrifadas com 500 mg/L de Photogem®, e após 30 minutos de incubação foram iluminadas por luz LED, nas doses de luz de 37,5 e 122 J/cm², respectivamente, três vezes por semana durante 15 dias. Foram removidas culturas micológicas da prótese e do palato e, além disso, foram obtidas fotografias padronizadas do palato no dia inicial (dia 0) e no fim do tratamento (dia 15) e nos intervalos de acompanhamento (dias 30, 60 e 90). As colônias foram quantificadas (UFC/mL) e identificadas através de testes bioquímicos. Ambos os tratamentos reduziram significativamente a quantidade de colônias (UFC/mL), no 30º dia do período de acompanhamento (p <0,05). Os grupos NYT e PDT apresentaram taxas clínicas de sucesso de 53% e 45%, respectivamente. No entanto a taxa de recidiva foi alta para ambos os grupos. A análise de identificação das espécies realizada neste estudo mostrou que a *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente. Os autores concluíram que a PDT foi tão eficaz quanto à aplicação tópica de nistatina na redução de UFC/mL de *Candida spp.* observadas tanto do palato quanto das próteses dos pacientes. Além disso, foram necessárias menos sessões de aplicação da PDT para atingir os mesmo resultados clínicos obtidos com aplicações diárias de nistatina.

Teixeira et al.⁶⁶ (2012) avaliou o efeito da PDT sobre biofilmes orais formados *in vitro* e *in situ*. Para o experimento *in vitro* os biofilmes de *S. mutans* (UA159) foram formados sobre as mostras de hidroxiapatita (HA) estéreis e foram avaliados após cinco dias de incubação (biofilme maduro). Após este período, os biofilmes formados *in vitro* foram tratados somente com o fossensibilizador TBO (100µg/mL) (P+L-), somente luz (P-L+), PDT (P+L+) e grupo controle (P-L-). Além disso, 21 voluntários utilizaram dispositivo palatino contendo oito amostras de esmalte dentário humano por sete dias. Os biofilmes obtidos formados em cada região do dispositivo, foram divididos nos grupos P+L+ (exposição ao TBO associado à iluminação com LED (660nm)) ou P-L-. A análise da viabilidade celular foi realizada pela contagem de colônias. Os resultados mostraram redução significativa na viabilidade de biofilmes *in vitro* após a PDT. Porém, a PDT foi ineficaz na inibição de biofilmes multi-espécies formados *in situ*.

O estudo realizado por Andrade et al.³ (2013) avaliou os efeitos do tempo de pré-iluminação (TPI) na PDT mediada por Cur sobre culturas planctônicas e biofilme de cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. As culturas planctônicas e biofilmes das espécies de *Candida* foram mantidos em contato com diferentes concentrações de Cur nos intervalos de tempo de 1, 5, 10 e 20 minutos (TPI) antes da iluminação por luz LED. Foram realizados controle de FS (amostras tratadas apenas com Cur, sem iluminação), controle de luz (amostras tratadas com a luz na ausência de Cur) e controle positivo (amostras que não foram expostas nem a Cur, nem a luz). Após a PDT, as suspensões foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose, enquanto que os resultados do biofilme foram obtidos por meio do método de redução de XTT. Além disso, foi realizada Microscopia Confocal de Varredura Laser (MCVL) para fornecer uma melhor compreensão da penetração Cur nos biofilmes após 5 e 20 minutos de contato. Os resultados mostraram que houve completa inativação das culturas planctônicas das três espécies de *Candida* quando a Cur na concentração de 20 μ M permaneceu em contato com as células por 5, 10 e 20 minutos no tempo de pré-iluminação. Os biofilmes mostraram redução significativa do metabolismo celular após PDT, sendo que as três espécies de *Candida* avaliadas sofreram maiores reduções do metabolismo celular com a associação de Cur na concentração de 40 μ M e TPI de 20min. Além disso, as observações de MCVL mostraram diferentes intensidades de emissões de fluorescência após 5 e 20 minutos de incubação. Desta forma, os autores concluíram que a fotoinativação de culturas planctônicas não foi TPI-dependente e que nos biofilmes a TPI-dependência diferiu entre as espécies avaliadas. Além disso, as observações de MCVL confirmou a necessidade de intervalos de tempo maiores para a Cur penetrar nas estruturas do biofilme.

Em 2013, Ribeiro et al.⁵⁶ realizaram um estudo para investigar o efeito fotodinâmico de diferentes concentrações de Cur e doses de luz LED na inativação de suspensões planctônicas de cepa padrão de *Staphylococcus aureus* susceptível a metilina (MSSA) e *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) por meio de contagem de colônias (UFC/mL). Além disso, foi avaliada a citotoxicidade da PDT em cultura celular de fibroblastos (L929) por meio da análise do metabolismo celular, utilizando para isto o teste de MTT e da morfologia celular utilizando MEV. As suspensões de MSSA foram tratadas com concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 μ M de Cur associadas as doses de luz de 18; 25,5; e 37,5 J/cm²; as suspensões

planctônicas de MRSA foram tratadas com 5, 10 e 20 μL e dose de luz de 37,5 J/cm^2 . Após a exposição ao FS, as suspensões foram iluminadas por LED. Foram obtidas diluições seriadas a partir de cada amostra, realizou-se plaqueamento e após 48 h contagem das colônias (UFC/mL). Para os fibroblastos, a viabilidade celular após à terapia fotodinâmica foi avaliada utilizando o ensaio de MTT e alterações morfológicas foram avaliadas por MEV. As concentrações da Cur que variaram de 0,1 a 20,0 μM em combinação com as doses de luz testadas provocaram inativação do MSSA. No entanto, apenas a concentração de 20 μM combinada com a maior dose de luz resultou em morte do MRSA. Essa combinação também promoveu uma redução de 80% no metabolismo celular dos fibroblastos e alterações morfológicas estavam presentes, indicando que a membrana da célula era o alvo principal da fototerapia. A combinação de Cur com luz LED causou inativação de ambas às cepas de *S. aureus* e podem representar uma alternativa de tratamento para inativação de MRSA.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

- ◆ Avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico das diferentes concentrações de PDZ (100, 150, 175, 200 e 250mg/L) associada à luz LED (660nm) na dose de 37,5J/cm² na inativação de biofilme multi-espécies, composto por *S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*, formado em fundo de placa de 96 orifícios.

- ◆ Avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico de aplicações sucessivas de PDT, mediada por PDZ (175 e 200mg/L) e luz LED (660nm) na dose de 37,5J/cm² na inativação de biofilmes multi-espécies, composto por *S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*, formado sobre amostras de resina acrílica.

- ◆ Avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico de diferentes concentrações do FS Curcumina (80, 100 e 120µM) associada à luz LED (455nm) na dose de 37,5J/cm² sobre biofilmes multi-espécies, composto por *S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*, formado por diferentes períodos (24 e 48h) sobre amostras de resina acrílica.

A decorative oval shape with a light green background and a pattern of overlapping, semi-transparent geometric shapes (squares and rectangles) in a slightly darker shade of green. The text is centered within this oval.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais

Para a realização da fase experimental do presente estudo, foram utilizados os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos:

4.1.1 Materiais de consumo

- Acetona (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Ácido Acético (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Água destilada
- Água Mili-Q
- Alça de inoculação 1 μ L (Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália)
- Alça de inoculação 10 μ L (Laborplast, Cassinetta di Lugagnano, MI, Itália)
- Alça estéril de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil)
- Cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028)
- Cepa padrão de *C. glabrata* (ATCC 2001)
- Cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175)
- Cloreto de Cálcio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cloreto de Potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cloreto de Sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Cubeta de 4,5 mL (Cartel, São Paulo, SP, Brasil)
- Curcumina/Curcumin, pureza $\geq 95\%$, Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Dextrose (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO), pureza $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Estantes de arames revestidos para tubos de ensaio 13 mm (RICILAB, São Paulo, SP, Brasil)
- Fosfato de Potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Frasco coletor universal translúcido estéril 80 mL (Alibaba, Shanghai, China)

- Gesso pedra tipo III Herodent (Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Glicose (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Isolante indicado para resina acrílica, Cel-Lac (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- KH_2PO_4 (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Kit de viabilidade Live/Dead BacLight™ (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Meio de cultura caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, EUA)
- Meio de cultura Chromagar Candida (Difco, Detroit, EUA)
- Meio de cultura Mitis Salivarius agar (Difco, Detroit, EUA)
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com clorofenicol (Acumedia Manufactures, Inc. Baltimore, Maryland, EUA)
- Meio de cultura YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco, Detroit, EUA)
- Menadiona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Mini swab (Cotton-baby, Higie-Plus Cottonbaby Ind. Com. Ltda., São José, SC, Brasil)
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Peptona (HIMEDIA, Mumbai, Índia)
- Photodithazine® (Moscou, Rússia)
- Placa de orifícios TPP® com 24 orifícios de fundo plano estéril, embaladas individualmente, (TPP, Trasadingen, Suíça).
- Placa de orifícios TPP® com 96 orifícios de fundo plano estéril, embaladas individualmente, (TPP, Trasadingen, Suíça).
- Placa de Petri descartável 90x15 mm estéril (Global Trade Technology, Monte Alto, SP, Brasil)
- Placas de vidros jateados com óxido de alumínio com rugosidade de aproximadamente 3,0 μm (Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil)
- Pó de Cristal Violeta (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Ponteiras amarelas para micropipeta 20-200 μL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)

- Ponteiros azuis para micropipeta 100-1000 μL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Ponteiros para micropipeta 10 mL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Ponteiros para micropipeta 5 mL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Resina para base de prótese, cor rosa médio, Vipi Wave, específica para micro-ondas, Lote nº 5485 (VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil)
- Sal de XTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis, estéreis (Pleion, Barueri, SP, Brasil)
- Silicona de condensação, Labor Mass, consistência pesada (Vipi Ind. e Com. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil)
- Sulfato de Magnésio (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Super Bonder (Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil)
- Tubo tipo eppendorf 1,5 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil)
- Tubo tipo Falcon de 15 mL, fundo cônico, estéril cônico (Biogen, São Paulo, SP, Brasil)
- Tubo tipo Falcon de 50 mL, fundo cônico, estéril cônico (Biogen, São Paulo, SP, Brasil)
- Vidro jateado com óxido de alumínio (Vidroplan ACP Comércio de Vidros Ltda. Araraquara, SP, Brasil)

4.1.2 Instrumentais

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil)
- Bico de Bunsen (J.Prolab, São José do Pinhal, PR, Brasil)
- Micropipeta de 0,5-10 μL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Micropipeta de 100-1000 μL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Micropipeta de 20-200 μL (BOECO, Hamburgo, Alemanha)
- Pinça clínica (DUFLEX, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Pipeta de 1 - 10 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia)
- Pipeta de 1 - 5 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia)
- Ponta Carbide PM nº 702 (JET, Canadá)
- Ponta de Tungstênio Maxicut 1508, (Edenta, Switzerland, Suíça)

- Pontas de borracha para acabamento e polimento em acrílico (KG Sorensen - Medical Burs Ind. e Com. de Pontas e Brocas Cirúrgicas Ltda, Cotia, SP, Brasil).
- Proveta graduada (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil)

4.1.3 Equipamentos

- Aparelho de luz LED, 455 nm, desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos, SP, Brasil
- Aparelho de luz LED, 660 nm, desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos, SP, Brasil
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. N° 6614 (Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil)
- Balança de precisão Modelo: BG 400. N° 016450 (GEHAKA – Ind. e Com. Eletro Eletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil).
- Centrífuga Eppendorf Modelo: 5810R (EPPENDORF AG, Hamburgo, Alemanha)
- Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600. (Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil)
- Espectrofotômetro UV-VIS 200-1000 nm banda: 5nm (Biospectro, Curitiba, PR, Brasil)
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- Estufa para secagem e esterilização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil)
- Jarra de microaerofilia (Permutation, Curitiba, PR, Brasil)
- Leitora de Microplacas TP Reader-Basic (ThermoPlate, São Paulo, SP, Brasil)
- Micromotor, fabricado por Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil;
- Micro-ondas Brastemp Crisp 27 (Brastemp, Manaus, AM, Brasil).
- Prensa hidráulica PM 2000 (Vipi Delta, Pirassununga, São Paulo, SP, Brasil)
- Rugosímetro digital portátil SurfTest SJ-400 (Mytutoyo Corporation, Tóquio, Japão).

4.2 Métodos

4.2.1 Agentes fotossensibilizadores

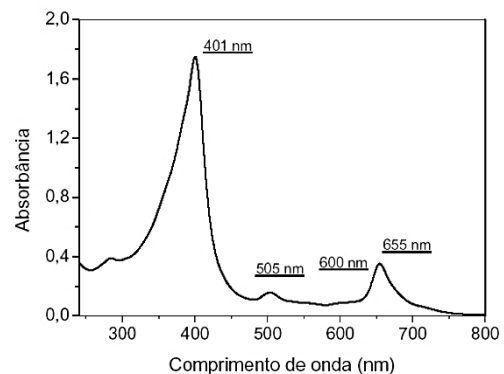
Para a fotossensibilização do biofilme multi-espécies foram utilizados os Fotossensibilizadores (FS) Photodithazine® (PDZ) e Curcumina (Cur). O cálculo das concentrações de cada FS utilizado neste estudo está demonstrado no Apêndice 1.

O PDZ é uma clorina de segunda geração, produzido a partir de uma substância extraída da cianobactéria *Spirulina platensis*, e fabricado na Rússia – Moscou. Apresenta-se na forma de um líquido verde-escuro e deve ser armazenado em um local protegido da luz e em temperatura inferior a 5°C. Este FS foi fornecido pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos – USP (IFSC) a uma concentração de 5.000 mg/L (Figura 1 e 2).

Figura 1 – embalagem comercial do agente FS Photodithazine®.



Figura 2 - Espectro de absorção óptica do Photodithazine®, elaborado pelo Laboratório de Biofotônica, IFSC, São Carlos, 2011.

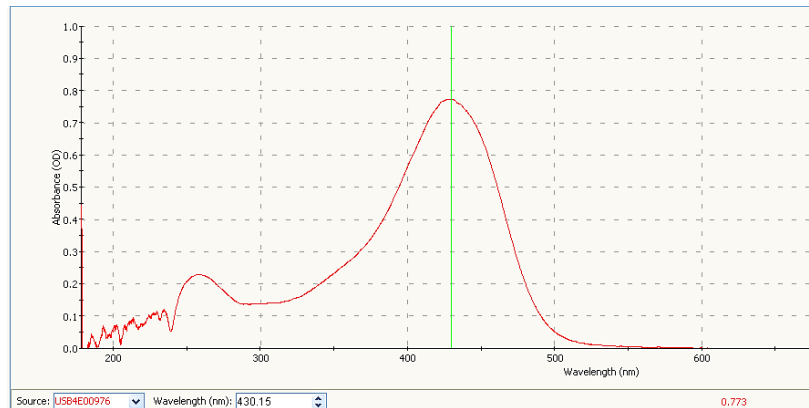


A Cur é um composto natural de coloração amarela extraída do rizoma da planta *Curcuma longa L* (açafrão), sendo comercializado na forma de pó amarelo-alaranjado, adquirido com pureza $\geq 95\%$ (marca Fluka), e armazenado a temperatura ambiente protegido da luz e de umidade. Em solução, a Cur apresenta uma banda característica de absorção com pico máximo em, aproximadamente, 430 nm (Figura 3 e 4).

Figura 3 – embalagem comercial do agente FS Cur (Sigma).



Figura 4 – Espectro de absorção óptica da Cur.



4.2.2 Fonte de luz

Cada um dos FS utilizados possui absorção de luz máxima em comprimentos de onda específicos, assim foram utilizados dois aparelhos de iluminação. Os aparelhos de LED utilizados neste estudo foram idealizados e desenvolvidos no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), da Universidade de São Paulo (USP). Para a iluminação do PDZ foi utilizado o aparelho “Dual Table” (LEDs vermelhos) com comprimento de onda de 660 nm e potência de 71,7 mW/cm². Para a iluminação da Cur foi utilizado o aparelho “Bio Table” (LEDs azuis) com comprimento de onda de 455 nm e potência de 22,0 mW/cm², (Figuras 5 e 6, respectivamente). O conhecimento da potência de saída do aparelho utilizado é um fator importante a ser considerado, uma vez que, juntamente com o tempo de iluminação, determina a quantidade de energia aplicada na amostra iluminada. Essa quantidade de energia é denominada dose de luz ou fluência, e é expressa pela energia por área (J/cm²). A fórmula e os cálculos para determinar o tempo de iluminação para a dose de luz utilizada para cada aparelho empregado neste estudo estão demonstrados no Apêndice 2.

Figura 5 – Dual Table com LED de comprimento de onda de ~660nm; potência de 71,7mW e dose de luz de 37,5J/cm².

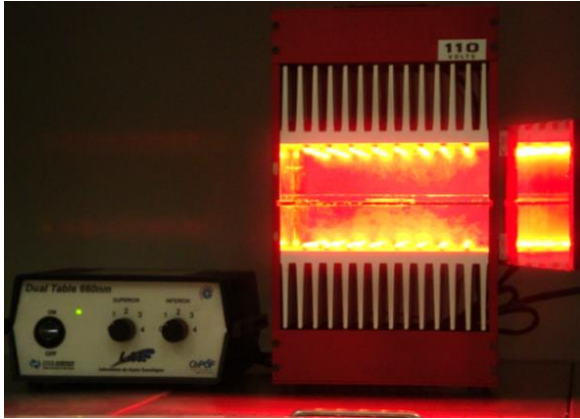
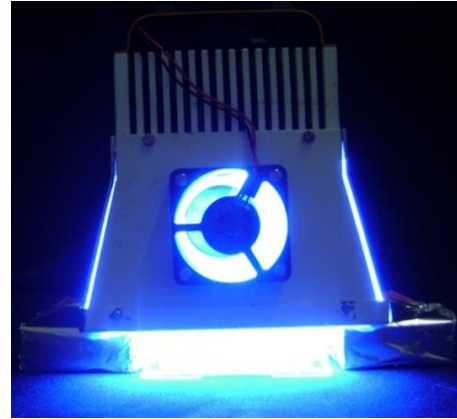


Figura 6 – BioTable com LED de comprimento de onda de ~455nm; potência de 22mW e dose de luz de 37,5J/cm².



4.2.3 Micro-organismos e condições de crescimento

Foi realizado cultivo e preparo dos inóculos das cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). As espécies de *Candida* foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud (SDA) e o *S. mutans* foi semeado em placa de Petri contendo meio de cultura Mitis Salivarius adicionado de Bacitracina (0,2 UI/mL), e em seguida, a placa com *S. mutans* foi colocada em jarra de microaerofilia. Tanto a jarra de microaerofilia quanto as placas de SDA foram incubadas a 37°C em estufa por 48 horas. Após este período, duas alças de cada levedura recém-cultivada foram adicionadas em frascos estéreis distintos, contendo 20 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB) adicionado de glicose 50 mM, e, em seguida, foram incubadas a 37 °C por 16 horas. Para o *S. mutans* duas alças foram colocadas em um frasco contendo 20 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37° C por 18 horas em jarra de microaerofilia.

Decorrido o período de incubação os micro-organismos foram centrifugados a 4000 rpm a 21°C por 5 minutos e lavados duas vezes com solução PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação. Todos os micro-organismos lavados foram ressuspensos em meio de

cultura caldo BHI e ajustados em espectrofotômetro (Biophotometer – Eppendorf) até a obtenção de suspensões padronizadas de 1×10^7 células/ml para cada uma das espécies de *Candida* e 1×10^8 células/ml para *S. mutans*⁵². Para isso foram utilizados os comprimentos de 520 nm para *C. albicans* e *C. glabrata* e 600 nm para o *S. mutans*.

4.2.4 Avaliação da eficácia PDT mediada por diferentes concentrações de PDZ associada à luz LED na inativação de biofilme multi-espécies formado em fundo de placa de orifícios.

Primeiramente neste estudo, foi avaliado o efeito fotodinâmico das diferentes concentrações de PDZ (100, 150, 175, 200 e 250mg/L) associada à luz LED (660nm) sobre biofilme multi-espécies formado em fundo de placa de 96 orifícios.

4.2.4.1 Formação do biofilme em fundo de placa de 96 orifícios

Após os ajustes das concentrações, foram colocados nos orifícios da placa alíquotas de 50µL das suspensões obtidas para *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. Em seguida as placas foram colocadas em jarras de microaerofilia e mantidas durante 90 minutos a 37 °C em agitação de 75 rpm (fase de adesão). Transcorrido esse período, as células não aderidas foram removidas por meio de lavagem dos orifícios da placa por duas vezes com solução de PBS. Em seguida, para a formação do biofilme foram pipetados 200µl de meio de cultura caldo BHI nos orifícios das placas e estas foram novamente colocadas em jarras de microaerofilia e incubadas a 37°C em agitação de 75 rpm por 48 horas. O biofilme foi formado em triplicata e em três ocasiões diferentes para a realização de cada teste microbiológico. Após esse período o biofilme foi submetido aos tratamentos, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1- Condições experimentais a que forma submetidos os biofilmes formados em fundo de placa de 96 orifícios

Grupos	Condições experimentais
P-L-	Amostras controles (sem fotossensibilização e iluminação). Neste grupo os micro-organismos foram expostos à solução salina permanecendo sobre a bancada pelo tempo referente ao período de pré-incubação e de exposição ao LED.
P-L+	Amostras controles de luz (iluminação na ausência de exposição ao FS). Neste grupo os micro-organismos foram expostos à solução salina pelo tempo referente ao período de pré-incubação e, foram expostos ao LED por 9 minutos.
P+L-	Amostras controle de FS (exposição ao FS na ausência de iluminação). Neste grupo os micro-organismos foram expostos ao PDZ (100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) pelo tempo de 20 minutos e, em seguida, a placa permaneceu sobre a bancada pelo tempo referente ao período de iluminação da aplicação da PDT.
P+L+	Amostras expostas ao FS PDZ (nas concentrações de 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) e a luz LED (660nm). Neste grupo os micro-organismos foram expostos ao PDZ pelo tempo de 20 minutos e, em seguida, a placa foi iluminada por 9 minutos, referente à dose de luz de 37,5 J/cm ² .

Após o período de 48 horas de incubação em estufa orbital, os biofilmes foram lavados, cuidadosamente, por duas vezes com PBS, e sobre os biofilmes correspondentes aos grupos P+L+ e P+L- foram colocados alíquotas de 200µL do FS PDZ nas concentrações de 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L. Em seguida, as placas foram envolvidas por papel alumínio, permanecendo nesta condição durante 20 minutos (tempo de pré-irradiação). Após este período as placas dos grupos P+L+ foram iluminadas com LED (~660nm) a uma potência de 37,5 J/cm², durante 9 minutos. As placas referentes ao grupo P+L- permaneceram sobre a bancada envolvida por papel alumínio por mais 9 minutos (tempo correspondente ao período de iluminação). Para o grupo P-L- foi colocado 200µL de solução salina (0,9% NaCl) sobre o biofilme e a placa foi incubada no escuro por 20 minutos, em seguida, permaneceu sobre a bancada por 9 minutos (tempo correspondente ao período de iluminação). Para o grupo P-L+, foram colocados 200µL de solução salina sobre o

biofilme, a placa foi incubada no escuro por 20 minutos, e em seguida foi iluminada com luz LED por 9 minutos.

4.2.4.2 Teste para a avaliação da viabilidade dos micro-organismos

◆ **Contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)**

Após os procedimentos experimentais os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, para destacar o biofilme da placa de 96 orifícios, o biofilme formado em cada orifício da placa foi esfregado com um mini-swab estéril por um período de 15 segundos. Este mini-swab foi transferido para o interior de um tubo do tipo Eppendorf contendo 900 µL de solução salina estéril e, em seguida, o tubo foi agitado em vortex durante 1 minuto para o desprendimento das células. Imediatamente após os procedimentos descritos foram obtidas diluições seriadas a partir do tubo inicial contendo o mini-swab, e 25 µl das diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram plaqueadas, em duplicata e em três ocasiões distintas, utilizando-se dois meios seletivos: ágar Mitis Salivarius Bacitracina e CHROMagar Candida (Figura 7). O meio de cultura CHROMagar Candida foi utilizado para a identificação presuntiva das espécies de *Candida*. Desta forma, as colônias com coloração verde, foram denominadas *C. albicans* e as com coloração roxa, *C. glabrata*. Após 48hs de incubação a 37°C as contagens de colônias da bactéria e das leveduras foram obtidas utilizando-se um contador digital de colônias (Phoenix CP 600 Plus, Phoenix Ind. e Com. Ltda. Científicos de Equipamentos Ltda, Araraquara, SP, Brasil).

Figura 7 – Placas de Chromagar Candida e ágar Mitis Salivarius Bacitracina



Após a contagem de colônias nos meios de cultura, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado utilizando a fórmula a seguir:

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

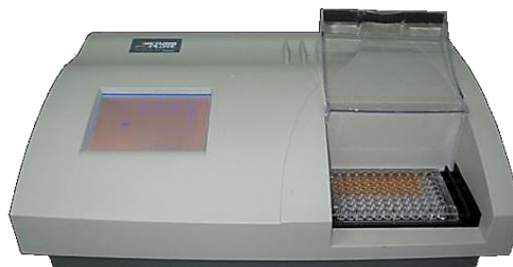
Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição quando nas sementeiras das placas.

◆ **Ensaio de XTT**

O metabolismo celular dos micro-organismos organizados em biofilme em cada grupo experimental foi avaliado pelo ensaio de XTT. A solução de XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) - 5 - [(phenylamino) carbonyl] - 2H - tetrazolium hydroxide), foi preparada utilizando-se água ultra pura, a uma concentração de 1mg/mL e mantido a -70°C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes de cada experimento. A solução de XTT utilizada para o teste de avaliação da atividade metabólica foi composta por: PBS glicosado, solução de XTT e menadiona recém-preparada, na seguinte proporção: 158 µl de PBS, 40 µl de XTT e 2 µl de menadiona.

Após a aplicação dos tratamentos propostos, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, foi colocado sobre o biofilme 200µL de solução de XTT e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C por 3 horas. Decorrido o período de incubação, o produto da degradação do XTT (sobrenadante) de cada orifício foi transferido para outra placa de 96 orifícios. A solução de XTT preparada para o experimento foi utilizada como “Blank”. Em seguida, essa placa foi posicionada no leitor de Elisa para leitura da absorbância utilizando-se o filtro 492 nm (Figura 8). O experimento foi realizado em triplicata em três ocasiões distintas.

Figura 8 – Leitor de Elisa



◆ ***Determinação da biomassa total (Coloração Cristal Violeta)***

Esse método foi utilizado para determinar a biomassa total dos biofilmes, incluindo a biomassa celular e a matriz de polissacarídeos extracelular. Após a realização dos tratamentos propostos, os biofilmes foram lavados duas vezes com solução de PBS. Em seguida, nos orifícios da placa de 96 orifícios, foram colocados 200 µL de metanol, e mantido durante 15 minutos. Após este período, o metanol foi removido, os biofilmes permaneceram sobre a bancada por um período de 20 minutos para evaporação do metanol, então, foi adicionado o corante cristal violeta 1% (CV) que foi mantido por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e as placas permaneceram sobre a bancada por mais 20 minutos para evaporação do PBS. Em seguida, foi adicionado 200 µL de ácido acético a 33% para solubilização do corante CV⁶².

A seguir, o produto resultante da solubilização do CV foi transferido para outra placa de 96 orifícios. A solução de ácido acético a 33% foi utilizada como “Blank”. Então essa placa foi posicionada no leitor de Elisa para leitura absorvância utilizando-se o filtro 570 nm (Thermo Plate – TP Reader). Esse teste foi realizado em triplicata e em três ocasiões diferentes.

◆ ***Microscopia Confocal de Varredura Laser (MCVL)***

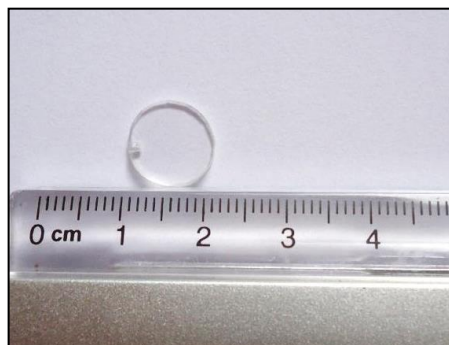
Após a aplicação das condições experimentais, a morte e a vida dos micro-organismos foi avaliada utilizando-se os reagentes SYTO-9 e de Iodeto de Propídeo (PI) do kit de viabilidade Live/Dead (BacLight™, Invitrogen) (Figura 9). O fluorocromo SYTO-9 penetra tanto em células viáveis, quanto em não viáveis, pigmentando-as de verde. Em contraste, o PI penetra somente em micro-organismos não viáveis, ou seja, aqueles que apresentam a membrana comprometida, tornando-se vermelhos. Utilizados simultaneamente em micro-organismos não viáveis, ambos os fluorocromos penetrarão, porém a cor será determinada pelo PI, pois o mesmo tem a capacidade de reduzir a coloração verde oferecida pelo SYTO-9, e proporcionar uma coloração avermelhada.

Figura 9 - Kit de viabilidade Live/Dead (BacLight™, Invitrogen), reagentes SYTO-9 e de Iodeto de Propídeo.



Para análise em MCVL em condições de aderência e formação de biofilme semelhante às encontradas quando o mesmo foi formado em placas de 96 orifícios, foram confeccionados discos com diâmetro de 10 mm a partir de placas poliestireno para a cultura de micro-organismo. Os discos foram obtidos por meio do corte do fundo de placa com Ponta Carbide PM nº 702, os excessos foram removidos com ponta Maxi Cut nº1508 e o acabamento das bordas foi realizado com borrachas de polimento (Figura 10).

Figura 10 - Discos de poliestireno obtido de fundo de placa para cultura.



Em seguida, os discos de poliestireno foram esterilizados em óxido de etileno (ACECIL, indústria e comércio em óxido de etileno, Campinas/SP), e colocados em placas de 24 orifícios para a formação do biofilme multi-espécies por 48 horas, de acordo com os procedimentos descritos previamente.

Para a realização do teste propriamente dito, foi preparada uma solução na proporção de 1mL de solução salina, 1 μ L de SYTO-9 e 1 μ L PI. Para a aquisição das imagens, foram selecionados os grupos cuja condição experimental proporcionou maior inativação microbiana nos teste anteriormente descritos (concentração de PDZ de 175 e 200mg/L associado à luz LED na dose de 37,5J/cm²). Estes grupos foram comparados ao grupo controle positivo (P-L-). Assim, após a formação do biofilme e realização dos tratamentos propostos, os discos de poliestireno foram lavados duas vezes com PBS e transferidos para outra placa de 24 orifícios contendo a solução preparada. Em seguida, a placa foi incubada no escuro por 15 minutos a temperatura de 37°C. Após esse período foi realizada uma lavagem dos discos de poliestireno com PBS e as amostras foram colocadas em suportes com lamínulas para serem examinadas por MCVL na objetiva de 40X. As imagens obtidas por meio desta técnica foram na escala de 20 μ m. Os fluocromos receberam excitação do laser de 488nm e os filtros utilizados foram de 530 e 610 para os reagentes SYTO-9 e de PI, respectivamente.

Após o ajuste do laser e a seleção dos filtros, o biofilme formado sobre o disco de poliestireno, na ausência dos fluorocromos, foi levado ao microscópio para avaliarmos se nessa condição estabelecida haveria algum micro-organismo que pudesse emitir fluorescência própria que interferisse na leitura dos fluocromos. Não havendo essa fluorescência foi observada apenas uma tela preta, então foi feita a microscopia de transmissão que demonstrou a presença dos micro-organismos nos discos, uma vez que a mesma é transparente e permitiu a passagem de luz.

4.2.5 Avaliação da eficácia de aplicações sucessivas da PDT mediada pelo PDZ associada à luz LED na inativação de biofilme multi-espécies formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica.

Após a realização dos tratamentos propostos em fundo de placa de 96 orifícios, foram definidas as concentrações de PDZ de 175 e 200 mg/L como as mais eficazes na inativação do biofilme. Dessa forma, essas concentrações foram selecionadas para serem avaliadas em corpos-de-prova de resina acrílica. Na segunda etapa do presente estudo foi avaliada a eficácia de uma e três aplicações

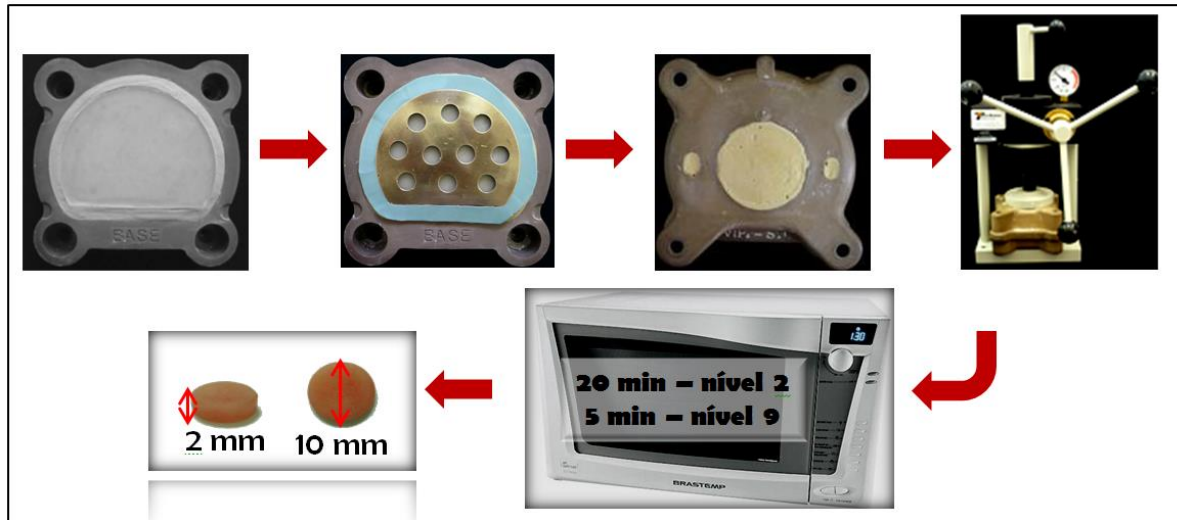
PDT mediada pela PDZ associada à luz LED na inativação dos biofilmes multi-espécies formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica.

4.2.5.1 *Confecção dos corpos-de-prova*

Foram confeccionados 360 corpos-de-prova para as avaliações das aplicações de PDT mediada por PDZ. Para a confecção de corpos-de-prova foi utilizada a resina para base de prótese Vipi Wave, cor-de-rosa, específica para micro-ondas e matrizes metálicas vazadas, com 10 orifícios, cada um com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. A parte inferior da mufla específica para micro-ondas foi isolada com Cel-lac e preenchida com gesso pedra, sobre o qual, foi imediatamente, posicionada uma placa de vidro jateada com óxido de alumínio, cuja rugosidade aproximou-se de 3,0 μm simulando a rugosidade encontrada na superfície interna de próteses⁷⁹. Após a presa do gesso, a matriz metálica contendo 10 orifícios foi fixada no vidro com Super Bonder, e ao redor desta matriz foi colocado silicone de condensação, proporcionado e manipulado de acordo com as instruções do fabricante, os excessos foram removidos com estilete. Sobre esta matriz foi fixada outra placa de vidro jateada com óxido de alumínio, a contra-mufla foi posicionada e preenchida com gesso pedra, finalizando a inclusão.

Após a presa, a mufla foi aberta e a matriz isolada com vaselina, então a resina foi proporcionada e manipulada de acordo com as instruções do fabricante (14 g de pó e 6,5 ml de líquido). Após o período de incorporação e homogeneização, a resina na fase plástica foi inserida nos orifícios da matriz. Em seguida, a mufla foi levada à prensa hidráulica e submetida à pressão de 1 tonelada por 30 minutos. Logo após, foi iniciado o processo de polimerização em micro-ondas de acordo com as instruções do fabricante que, consistiu de 20 minutos na potência baixa (nível 2), adicionados de 5 minutos na potência alta (nível 9) do aparelho. Após o resfriamento da mufla à temperatura ambiente, a mesma foi aberta e os corpos-de-prova foram retirados, sendo os excessos laterais removidos com o auxílio de uma ponta Maxicut (n°1508) em baixa rotação (Figura 11).

Figura 11 – Confeção dos corpos-de-prova em resina acrílica Vipi Wave.



4.2.5.2 Leitura da rugosidade

Após a confecção dos corpos-de-prova foram realizadas quatro leituras de rugosidade em cada corpo-de-prova (duas de cada lado) por meio do rugosímetro digital portátil SurfTest SJ-400 (Mytutoyo Corporation, Tóquio, Japão). A resolução utilizada foi de $0,01\mu\text{m}$, com velocidade de $0,5\text{ mm/s}$ comprimento transversal de $2,4\text{ mm}$ e aferições em intervalos (cutoff length) de $0,8\text{ mm}$ (Figura 12). Os corpos-de-prova que foram selecionados para utilização no experimento apresentaram a média de leitura da rugosidade no intervalo de $2,7$ a $3,7\mu\text{m}^{41,59}$. Em seguida os corpos-de-prova foram enviados para ACECIL - Central de Esterilização Com. Ind. Ltda (Campinas/SP) para a esterilização por meio de óxido de etileno.

Figura 12 – Rugosímetro digital portátil Mytutoyo SurfTest SJ-400.



4.2.5.3 Formação do biofilme multi-espécies sobre os corpos-de-prova

Conforme descrito previamente, a reativação dos micro-organismos (37°C overnight) foi realizada por meio de cultura YNB (espécies de *Candida*) e caldo BHI (*Streptococcus mutans*), em seguida, as células microbianas foram centrifugadas (4000 rpm, durante 5 minutos), lavadas em PBS estéril e, então, ressuspendidas em caldo BHI na concentração celular equivalente a 10^7 células/mL para células fúngicas e 10^8 células/mL para células bacterianas ajustadas em espectrofotômetro nos filtros de 520 nm e 600 nm para fungos e bactérias, respectivamente.

Para a formação do biofilme sobre os corpos-de-prova de resina acrílica, alíquotas de 500µL da suspensão de celular padronizada de cada espécie foram transferidas para os orifícios de uma placa de 24 orifícios contendo o corpo-de-prova. Após 90 minutos de incubação a 37°C em jarra de microaerofilia sob agitação de 75 rpm (fase de adesão), foram realizadas duas lavagens com PBS para remoção de células não aderidas. Em seguida, os corpos-de-prova foram transferidos para outra placa de 24 orifícios contendo 2 mL de meio de cultura caldo BHI e, em seguida, foram incubadas em jarra de microaerofilia a 37°C sob agitação de 75 rpm por 48 horas (formação do biofilme).

Após o período de 48 horas de incubação, os corpos-de-prova foram lavados, cuidadosamente, duas vezes com PBS. Em seguida, foram submetidos aos tratamentos propostos (Quadro 2). Os corpos-de-prova correspondentes aos grupos P+L+ (I), P+L- (I), P+L+ (III), P+L- (III) receberam 2 mL do FS PDZ nas concentrações de 175 ou 200 mg/L. Logo após as placas foram envolvidas por papel alumínio, permanecendo nesta condição durante 20 minutos (tempo de pré-incubação). Após este período as placas referentes aos grupos P+L+ (I) e P+L+ (III) foram iluminadas com LED (~660nm) na dose de luz de 37,5 J/cm², resultando em 9 minutos de iluminação. Os corpos-de-prova submetidos às condições experimentais P-L- (I), P-L- (III), P-L+ (I) e P-L+ (III) receberam 2mL de solução salina e as placas foram incubadas no escuro por 20 minutos. Após este período, os grupos controles P-L- (I), P-L- (III) permaneceram sobre a bancada por 9 minutos (tempos correspondente ao período de iluminação) e os grupos P-L+ (I) e P-L+ (III), foram iluminados com luz LED por 9 minutos. É importante destacar que para os grupos P+L+ (III), P+L- (III), P-L- (III) e P-L+ (III) os tratamentos destinados a cada grupo foram repetidos por três vezes sucessivas.

Quadro 2 - Grupos experimentais referentes às aplicações sucessivas da PDT mediada pelo FS Photodithazine® sobre biofilmes formados nos corpos-de-prova de resina acrílica

Grupos	Condições Experimentais
P-L- (I)	Amostras controles (sem fotossensibilização e iluminação). Neste grupo os micro-organismos foram expostos à solução salina permanecendo sobre a bancada pelo tempo referente ao período de pré-incubação e de exposição ao LED.
P-L- (III)	Amostras controles (sem fotossensibilização e iluminação). Neste grupo os micro-organismos foram expostos à solução salina permanecendo sobre a bancada pelo tempo referente ao período de pré-incubação e de exposição ao LED. Este procedimento foi repetido por três vezes sucessivas.
P-L+ (I)	Amostras controles de luz (iluminação na ausência de exposição ao FS). Neste grupo os micro-organismos foram expostos à solução salina pelo tempo referente ao período de pré-incubação e, foram expostos ao LED por 9 minutos.
P-L+ (III)	Amostras controles de luz (iluminação na ausência de exposição ao FS). Neste grupo os micro-organismos foram expostos à solução salina pelo tempo referente ao período de pré-incubação e, foram expostos ao LED por 9 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes sucessivas.
P+L- (I)	Amostras controle de FS (exposição ao FS na ausência de iluminação). Neste grupo os micro-organismos foram expostos ao PDZ (175 e 200mg/L) pelo mesmo tempo de 20 min e, em seguida, a placa permaneceu sobre a bancada pelo tempo referente ao período de iluminação da aplicação da PDT.
P+L- (III)	Amostras controle de FS (exposição ao FS na ausência de iluminação). Neste grupo os micro-organismos foram expostos ao PDZ (175 e 200mg/L) pelo tempo de 20 min (pré-incubação) e, em seguida, a placa permaneceu sobre a bancada pelo tempo referente ao período de iluminação da aplicação da PDT. Este procedimento foi repetido por três vezes sucessivas.
P+L+ (I)	Amostras que receberam apenas uma aplicação da PDT, mediada pelo FS PDZ nas concentrações de 175 e 200 mg/L associado ao LED (660nm). Neste grupo os micro-organismos foram expostos ao PDZ pelo tempo de 20 minutos (pré-incubação) e, em seguida, a placa foi iluminada por 9 minutos, referente à dose de luz de 37,5 J/cm ² .
P+L+ (III)	Amostras que receberam três aplicações sucessivas da PDT, mediada pelo FS PDZ, nas concentrações de 175 e 200 mg/L associado ao LED (660nm) de potência de 71,7mW, na dose de luz de 37,5 J/cm ² . Neste grupo os micro-organismos foram expostos ao PDZ (175 e 200mg/L) pelo tempo de 20 min (pré-incubação) e, em seguida, a placa foi exposta ao LED por 9 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes sucessivas.

4.2.5.2 Testes para a avaliação da viabilidade dos micro-organismos

◆ **Contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)**

Após os tratamentos descritos, os corpos-de-prova foram removidos dos orifícios das placas e colocados em tubos tipo Falcon contendo 4,5mL de solução salina estéril. Os tubos foram submetidos ao vórtex por 1minuto cada para o desprendimento do biofilme dos corpos-de-prova para a solução salina. A partir deste Falcon, foram realizadas as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} e, em seguida, semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Chromagar (seletivo para a identificação presuntiva de espécies de *Candida*) e Mitis Salivarius ágar (seletivo para *S. mutans*). Os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicatas. Após 48 horas de incubação a 37° C, as placas de Petri referentes às amostras das condições experimentais avaliadas foram submetidas à contagem de colônias e os números de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) foram calculados, conforme descrito anteriormente.

◆ **Ensaio de XTT**

O metabolismo celular dos micro-organismos organizados em biofilme sobre os corpos-de-prova foram avaliados pelo ensaio de XTT. A solução de XTT foi preparada utilizando-se água ultrapura, a uma concentração de 1mg/ml e mantido a -70° C. Após a aplicação do método proposto para inativação de micro-organismos, os corpos-de-prova foram lavados duas vezes com PBS e transferidos para uma nova placa de cultura de células estéreis com 24 orifícios, contendo PBS glicosado (200 mM de glicose), solução de XTT e menadiona recém-preparada, na seguinte proporção: 158 μ l de PBS glicosado, 40 μ l de XTT e 2 μ l de menadiona em cada orifício. Em seguida a placa foi incubada no escuro a 37° C por 3 horas. Decorrido o período de incubação, alíquotas de 200 μ L do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidas para os orifícios de uma placa de leitura de 96 orifícios (Elisa) e foi realizada a leitura da absorbância utilizando o espectrofotômetro com filtro 492 nm.

◆ ***Determinação da biomassa total (Coloração cristal violeta)***

Após a formação dos biofilmes sobre os corpos-de-prova, os mesmos foram lavados com 2 ml de solução de PBS. Os corpos-de-prova foram transferidos para novas placas de cultura de 24 orifícios e 2 ml de metanol foi adicionado em cada orifício e mantido durante 15 minutos. Após este período, o metanol foi removido, os biofilmes permaneceram sobre a bancada por um período de 20 minutos para evaporação do metanol, então, foi adicionado o corante cristal violeta 1% (CV) que foi mantido por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e as placas permaneceram sobre a bancada por mais 20 minutos para evaporação do PBS. Em seguida, foi adicionado 2 mL de ácido acético a 33% para solubilização do corante CV. Alíquotas de 200 µl desse produto resultante foram transferidas para o orifício de uma placa de 96 orifícios para leitura de absorbância utilizando-se o espectrofotômetro com filtro 570 nm (Thermo Plate – TP Reader).

◆ ***Microscopia Confocal de Varredura Laser (MCVL)***

Para a realização do teste propriamente dito, foi preparada uma solução na proporção de 1mL de solução salina, 1µL de SYTO-9 e 1µL PI. Para a aquisição das imagens, foram selecionados os grupos experimentais (P200+L+(I) e P200+L+(III)), para os quais foram realizada uma e três aplicações de PDT, mediada por PDZ na concentração de 200mg/L associada a luz LED (37,5J/cm²) e comparados aos seus respectivos controles P-L- (I) e P-L- (III). Assim, após a formação do biofilme e realização dos tratamentos propostos, os corpos-de-prova foram lavados duas vezes com PBS e transferidos para outra placa de 24 orifícios contendo a solução preparada. Em seguida, a placa foi incubada no escuro por 15 minutos a temperatura de 37°C. Após esse período foi realizada uma lavagem dos corpos-de-prova com PBS e as amostras foram colocadas em suportes com lamínulas para serem examinadas por MCVL na objetiva de 40X. As imagens obtidas por meio desta técnica foram na escala de 20µm. Os fluocromos receberam excitação do laser de 488nm e os filtros utilizados foram de 530 e 610 para os reagentes SYTO-9 e de PI, respectivamente.

4.2.6 Avaliação da eficácia de diferentes concentrações do FS Cur (80, 100 e 120µM) associada e luz LED (455nm) sobre biofilmes multi-espécies cultivados por diferentes períodos (24 e 48h) sobre corpos-de-prova de resina acrílica.

4.2.6.1 Formação de biofilme sobre corpos-de-prova de resina acrílica por 24 e 48 horas

Para a terceira etapa deste estudo foram confeccionados 480 corpos-de-prova como descritos anteriormente. Os micro-organismos foram reativados a 37°C overnight nos meios de cultura YNB (espécies de *Candida*) e caldo BHI (*Streptococcus mutans*). Em seguida os micro-organismos foram lavados e centrifugados em PBS (4000 rpm, durante 5 minutos) e ressuspensos em caldo BHI. A concentração celular foi ajustada em espectrofotômetro a 10^7 células/mL para células fúngicas e 10^8 células/mL para células bacterianas, nos filtros de 520 nm e 600 nm, respectivamente.

Para a formação do biofilme sobre os corpos-de-prova de resina acrílica, alíquotas de 500µL da suspensão de celular padronizada de cada espécie foram transferidas para os orifícios de uma placa de 24 orifícios contendo o corpo-de-prova. Após 90 minutos de incubação a 37°C em jarra de microaerofilia sob agitação de 75 rpm (fase de adesão) foram realizadas duas lavagens com PBS para remoção de células não aderidas. Em seguida, os corpos-de-prova foram transferidos para outra placa de 24 orifícios contendo 2 mL de meio de cultura caldo BHI e, em seguida, foram incubadas em jarra de microaerofilia a 37°C sob agitação de 75 rpm por 24 ou 48 horas (formação do biofilme).

Após os períodos de incubação por 24 ou 48 horas a 37°C e agitação de 75 rpm, os biofilmes foram lavados, cuidadosamente, duas vezes com PBS. Em seguida, os corpos-de-prova foram submetidos aos tratamentos do Quadro 3. Os grupos P+L+ (24h), P+L- (24h), P+L+ (48h), P+L- (48h) receberam 2 mL do FS Cur nas concentrações de 80, 100 e 120µM, que correspondem a 30 mg/L, 36 mg/L e 44 mg/L, respectivamente. Em seguida as placas foram envolvidas por papel alumínio, permanecendo no escuro nesta condição por 20 minutos (tempo de pré-iluminação). Após este período as placas referentes aos grupos P+L+ (24h) e P+L+

(48h) foram iluminadas com LED (~455nm) na dose de luz de 37,5 J/cm², resultando em 29 minutos de iluminação, e as placas dos grupos P+L- (24h) e P+L- (48h) permaneceram sobre a bancada pelo período referente à iluminação (29 minutos). Os grupos submetidos às condições experimentais P-L- (24h), P-L+ (24h), P-L- (48h), e P-L+ (48h) receberam 2 mL de solução salina, em seguida as placas foram envolvidas por papel alumínio, permanecendo no escuro nesta condição por 20 minutos (tempo de pré-iluminação). Após este período, os grupos P-L+ (24h) e P-L+ (48h), foram iluminados com luz LED por 29 minutos, e os grupos P-L- (24h), P-L- (48h) permaneceram sobre a bancada por 29 minutos (tempos correspondente ao período de iluminação).

Quadro 3 - Grupos experimentais referentes às aplicações da PDT mediada pelo FS Cur sobre os biofilmes formados por 24 e 48 horas sobre corpos-de-prova de resina acrílica

Grupos	Condições Experimentais
P-L- (24h)	Amostras controles (sem fotossensibilização e iluminação). Neste grupo o biofilme formado por 24h foi exposto à solução salina pelo mesmo tempo que os grupos que receberam à aplicação da PDT.
P-L+ (24h)	Amostras controles de luz (iluminação na ausência de exposição ao FS). Neste grupo o biofilme formado por 24h foi exposto à solução salina pelo tempo de pré-incubação (20 minutos) e, exposto à Luz pelo tempo referente à aplicação da PDT (29 minutos).
P+L- (24h)	Amostras controle de FS (exposição ao FS na ausência de iluminação). Neste grupo o biofilme formado por 24h foi exposto a Cur (80, 100 e 120 μ M) pelo tempo de incubação de 20 minutos e, em seguida, a placa permaneceu sobre a bancada pelo mesmo tempo de iluminação referente a aplicação da luz na PDT (29 minutos).
P+L+ (24h)	Amostras que receberam a aplicação da PDT, mediada pelo FS Cur 80, 100 e 120 μ M associado ao LED (455nm) de potência de 22mW. Neste grupo o biofilme formado por 24h foi exposto a Cur (80, 100 e 120 μ M) pelo tempo de incubação de 20 minutos e, em seguida, a placa foi iluminada por 29 minutos, referente à dose de luz de 37,5 J/cm ² .
P-L- (48h)	Amostras controles (sem fotossensibilização e iluminação). Neste grupo o biofilme formado por 48h foi exposto à solução salina pelo mesmo tempo que os grupos que receberam à aplicação da PDT.
P-L+ (48h)	Amostras controles de luz (iluminação na ausência de exposição ao FS). Neste grupo o biofilme formado por 48h foi exposto à solução salina pelo mesmo tempo de pré-incubação e, exposto à Luz pelo tempo referente à aplicação da PDT.
P+L- (48h)	Amostras controle de FS (exposição ao FS na ausência de iluminação). Neste grupo o biofilme formado por 48h foi exposto a Cur (80, 100 e 120 μ M) pelo tempo de incubação de 20 minutos e, em seguida, a placa permaneceu sobre a bancada pelo mesmo tempo de iluminação referente a aplicação da luz na PDT (29 minutos).
P+L+ (48h)	Amostras que receberam a aplicação da PDT, mediada pelo FS Cur 80, 100 e 120 μ M associado ao LED (455nm) de potência de 22 mW. Neste grupo o biofilme formado por 48h foi exposto a Cur (80, 100 e 120 μ M) pelo tempo de incubação de 20 minutos e, em seguida, a placa foi iluminada por 29 minutos, referente à dose de luz de 37,5 J/cm ² .

Posteriormente a aplicação dos tratamentos propostos, a viabilidade dos micro-organismos foi avaliada por meio da quantificação de unidades formadoras de

colônia (UFC), atividade metabólica (ensaio do XTT), determinação da biomassa total (coloração cristal violeta). Para a aquisição das imagens por MCVL, foram selecionados os grupos cuja condição experimental proporcionou maior inativação microbiana nos teste anteriormente descritos (concentração de 120 μ M associado à luz LED) para os períodos de 24 e 48 horas (P120+L+(24h) e P120+L+(48h)), e estes grupos foram comparados aos grupos controles positivo P-L- (24h) e P-L- (48h). Além disso, foi obtida imagem do grupo no qual a presença de Cur a 120 μ M na ausência de luz promoveu redução microbiana (P120+L-). Todos os testes aplicados para esta terceira parte do estudo foram semelhantes aos já descritos anteriormente.

Metodologia estatística

Cada biofilme foi formado em triplicata e em três ocasiões diferentes para cada condição experimental e para cada teste microbiológico aplicado. Os valores de UFC/mL foram transformados em valores de logaritmo (\log_{10}) para a análise neste estudo. Os dados obtidos para cada avaliação de biofilme foram analisados com o objetivo de comparar o efeito da PDT (P+L+), com seus respectivos grupos controles (P-L-, P+L- e P-L+). Quando os pressupostos normalidade de homogeneidade foram cumpridos, utilizou-se o teste de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey, caso contrário, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn. Para as análises foi utilizado o nível de significância de 5%.

Resultados

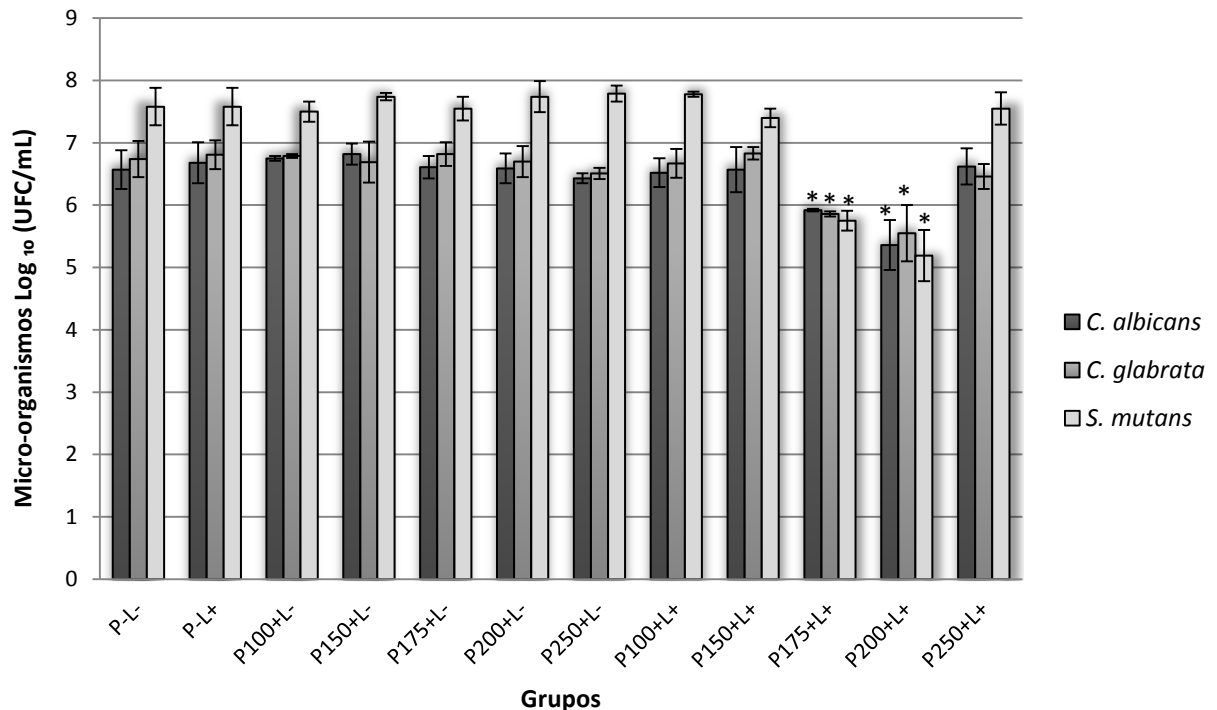
5 RESULTADOS

5.1 Resultados da Avaliação da Eficácia da PDT Mediada por Diferentes Concentrações de PDZ Associada à Luz LED na Inativação de Biofilme Multi-Espécies Formado em Fundo de Placa de Orifícios (Apêndice 3).

5.1.1 Análise quantitativa da viabilidade do biofilme (UFC/mL)

Para a análise estatística da viabilidade das espécies microbianas presentes no biofilme, os valores de UFC/mL foram transformados em valores de logaritmo (\log_{10}) e utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. A Figura 13 representa as médias e os desvios padrão de UFC/mL (\log_{10}) do biofilme multi-espécies, formado por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* nas diferentes condições experimentais (100, 150, 175, 200 e 250 mg/L). A PDT promoveu redução significativa ($P < 0,05$) das três espécies avaliadas em comparação ao grupo controle (P-L-), quando o PDZ foi utilizado nas concentrações de 175 e 200 mg / mL associado com a luz de LED. A maior redução na viabilidade das células foi detectada para o grupo no qual foi utilizada a concentração de 200 mg/L de PDZ em associação com a luz LED, 1,21 \log_{10} para a *C. albicans*, 1,19 \log_{10} para a *C. glabrata* e 2,39 \log_{10} para o *S. mutans*, quando comparado com o grupo controle positivo (P-L-). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos P-L-, P+L- e P-L+.

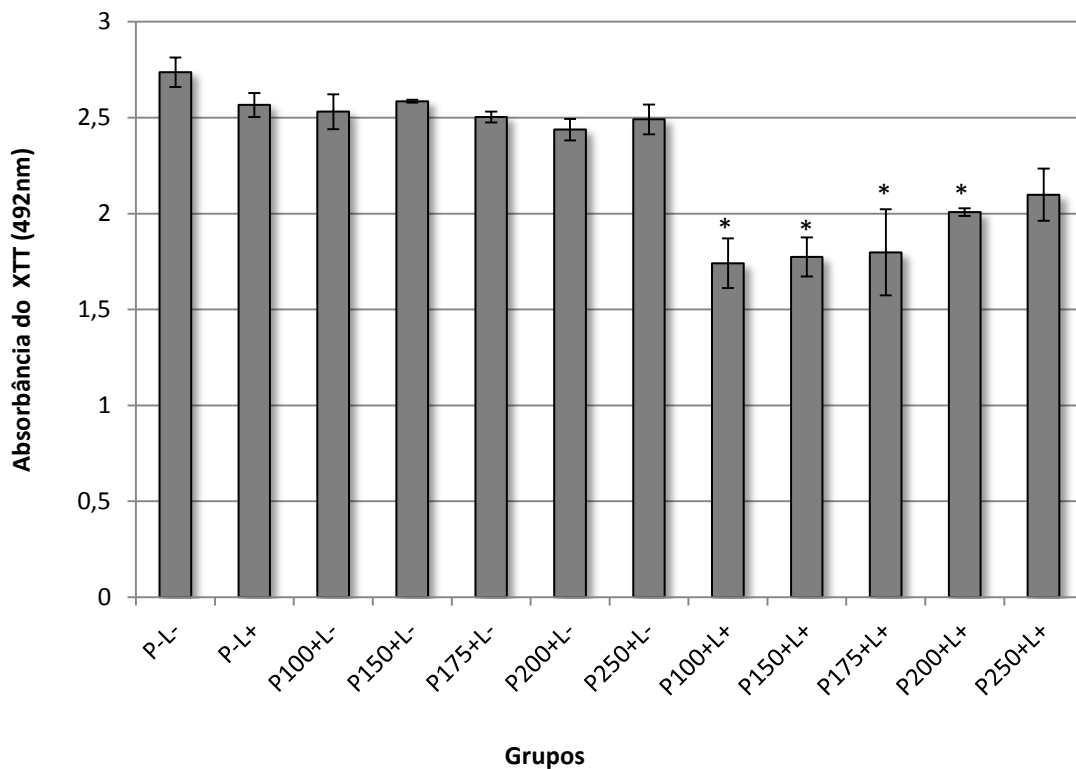
Figura 13 - Médias dos valores da viabilidade celular em Log_{10} (UFC / mL) de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. As barras de erro: desvio padrão. * significa diferença significativa em relação ao controle (P-L-).



5.1.2 Análise quantitativa da atividade metabólica (teste de redução do XTT)

Para a análise estatística da atividade metabólica do biofilme, utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. A Figura 14 representa as médias e o desvio padrão da absorbância obtido por meio do ensaio de redução de XTT. Foi observada redução significativa ($P < 0,05$) no metabolismo celular quando os biofilmes foram submetidos às concentrações de 100 mg/L, 150 mg/L, 175 mg/L e 200 mg/L de PDZ e iluminados com luz LED (grupos P+L+) em comparação com o grupo controle positivo (P-L-). Foi verificado que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos P-L-, P+L- e P-L+.

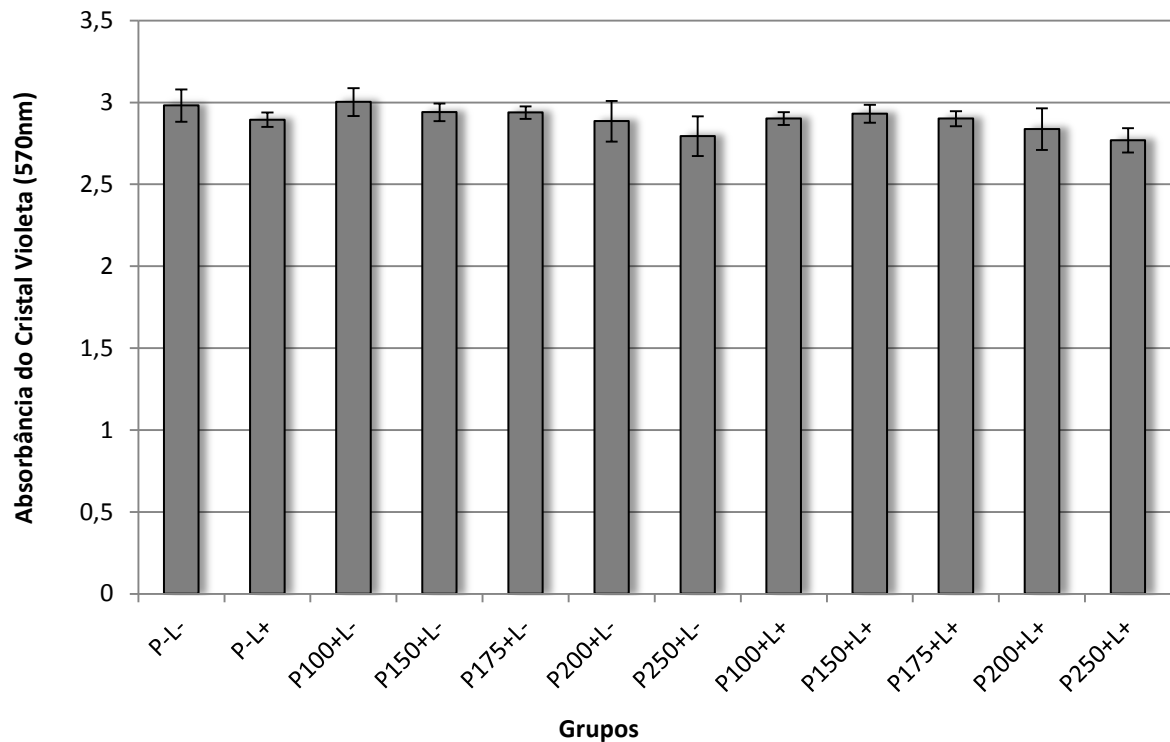
Figuras 14 - Médias dos valores da atividade metabólica do biofilme multi-espécies (absorbância do ensaio do XTT no filtro de 492 nm). As barras de erro: desvio padrão. * significa diferença significativa em relação ao controle (P-L-).



5.1.3 Análise quantitativa da biomassa total do biofilme (coloração cristal violeta)

Para a análise estatística da biomassa total do biofilme utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. A Figura 15 apresenta os valores médios e desvio padrão da absorbância obtida por meio do ensaio de biomassa total (coloração CV) para todos os grupos. Em oposição às outras avaliações realizadas (UFC/mL e XTT), os resultados obtidos para o ensaio da biomassa total não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$).

Figuras 15 - Médias dos valores do ensaio da biomassa total (CV) do biofilme multi-espécies (absorbância do ensaio de Biomassa Total no filtro de 570 nm). Barra de erros: desvio padrão.



5.1.4 Análise do biofilme por Microscopia Confocal de Varredura Laser (MCVL)

Imagens obtidas para visualização da viabilidade e arranjo espacial do biofilme multi-espécies composto por *S. mutans*, *C. albicans* e *C. glabrata*. Os biofilmes foram cultivados em discos de poliestireno e marcados com os fluorocromos (SYTO-9 e PI) do kit BacLight Live/Dead e em seguida foram obtidas as imagens pelo MCVL. Os micro-organismos em vermelho foram considerados mortos (PI), enquanto que os micro-organismos em verde considerados vivos (SYTO-9). As imagens obtidas a partir da MCVL (Figura 16a) mostram que, na ausência do SYTO-9 e PI, não foi verificado qualquer fluorescência emitida pelos biofilmes. A presença de micro-organismos sobre os discos de poliestireno foi observada pelo modo de transmissão (Figura 16b). A secção transversal das

amostras mostrou uma espessura do biofilme de 19 μ m, 18 μ m e 19 μ m nas Figuras 17b, 18b e 18d, respectivamente. Além disso, foi observado aumento de células fluorescentes em vermelho, sinalizando a ruptura e morte das células dos biofilmes submetidos a PDT (Figura 18 a,b,c,d), quando comparados ao grupo controle (Figura 17 a, b).

Figura 16 – Imagens do biofilme multi-espécies na ausência dos fluorocromos SYTO-9 e PI. (a) imagem de por MCVL do biofilme na ausência de SYTO-9 e PI, (b) Imagem de transmitância do biofilme multi-espécies.

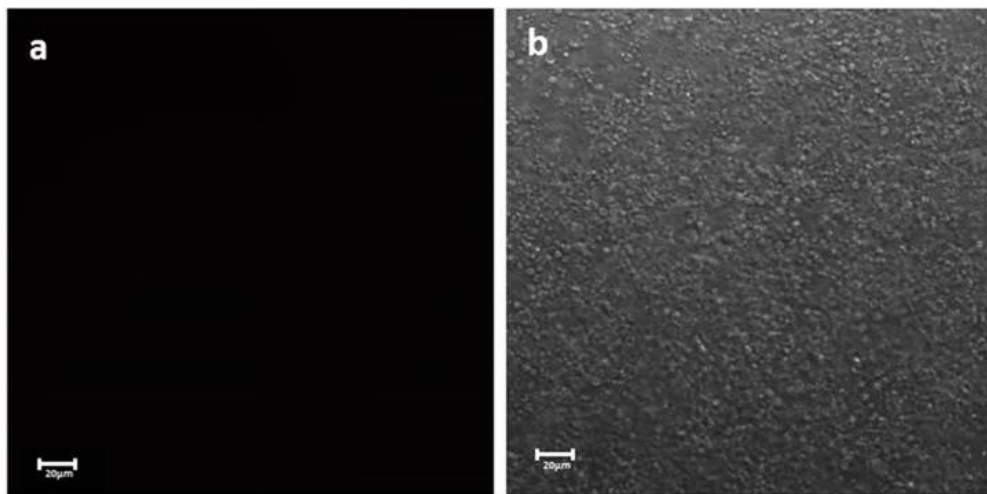


Figura 17 – Biofilmes, multi-espécies, marcados com os fluorocromos SYTO-9 e PI e obtenção das imagens por MCVL. Os micro-organismos em vermelho são considerados mortos (PI), enquanto que os micro-organismos em verde estão vivos (SYTO-9). (a) Imagem do grupo de controle positivo (P-L-). (b) Secção transversal e vista lateral do grupo controle (P-L-), espessura de 19,0 μ m do biofilme (linha amarela).

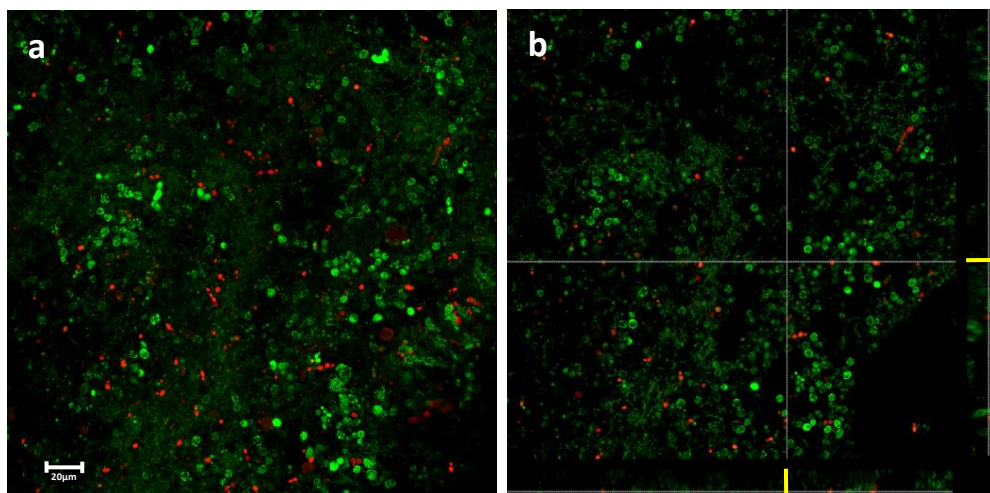
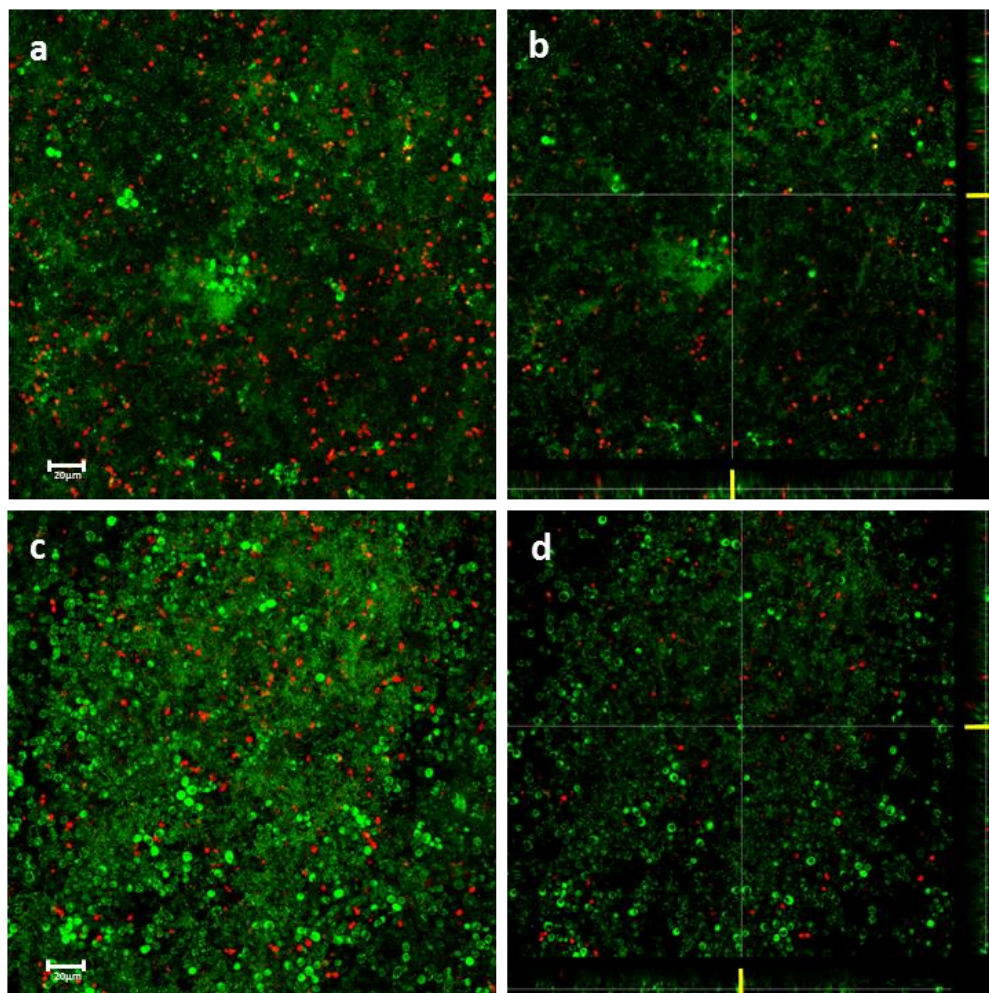


Figura 18 – Biofilmes, multi-espécies, marcados com os fluorocromos SYTO-9 e PI e obtenção das imagens por MCVL. Os micro-organismos em vermelho são considerados mortos (PI), enquanto que os micro-organismos em verde estão vivos (SYTO-9). (a) imagem do biofilme após a PTD (PDZ (175mg/mL) associado à luz LED na dose de $37,5 \text{ J/cm}^2$). (b) Secção transversal e vista lateral do biofilme após a PTD (PDZ (175mg/mL) associado à luz LED na dose de $37,5 \text{ J/cm}^2$) e espessura de $18,0 \mu\text{m}$ (linha amarela). (c) imagens de biofilmes após a PDT (PDZ (200mg/mL) associado à luz LED na dose de $37,5 \text{ J/cm}^2$). (d) Secção transversal e vista lateral após PTD (PDZ (200mg/mL) associado à luz LED na dose de $37,5 \text{ J/cm}^2$), e espessura de $19,0 \mu\text{m}$ (linha amarela).



5.2 Avaliação da Eficácia de Aplicações Sucessivas da PDT Mediada pelo PDZ Associada à Luz LED na Inativação de Biofilme Multi-Espécies Formado Sobre Corpos-De-Prova de Resina Acrílica (Apêndice 3).

5.2.1 Análise quantitativa da viabilidade do biofilme (UFC/mL)

Para a análise estatística da viabilidade das espécies microbianas presentes no biofilme, os valores de UFC/mL foram transformados em valores de logaritmo (\log_{10}) e utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn.

Para *C. albicans*, o teste de Kruskal-Wallis demonstrou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos PDT (P+L+) e os demais grupos (P+L, P-L+ e P-L-), independentemente da concentração utilizada ou do número de aplicações de PDT realizadas (Figura 19).

Para *C. glabrata*, de acordo com o teste post-hoc de Dunn, foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) para os valores de log (UFC/mL) para uma ou três aplicações de PDT (P+L+ (I) e P+L+ (III)) para ambas as concentrações de PDZ, quando comparadas aos seus respectivos grupos controles positivos (P-L-(I) e P-L-(III)). Porém, a utilização de diferentes concentrações de PDZ (175 e 200mg/L) na PDT não apresentou diferença estatística entre si, seja quando realizada uma ou três aplicações sucessivas de PDT (Figura 20).

O teste de Dunn, também mostrou redução logarítmica significativa ($P < 0,05$) para os valores de *S. mutans*, após uma e três aplicações de PDT (P+L+(I) e P+L+(III)) para ambas as concentrações de PDZ, quando comparadas aos respectivos controles (P-L-(I) e P-L-(III)). A utilização das concentrações de 175 e 200mg/L não apresentaram diferença estatística entre si, independentemente da quantidade de aplicações (Figura 21).

Figura 19 – Gráfico Box-plot da variabilidade de *C. albicans* em Log₁₀ (UFC / mL) dos biofilmes submetidos a uma ou três aplicações de PDT.

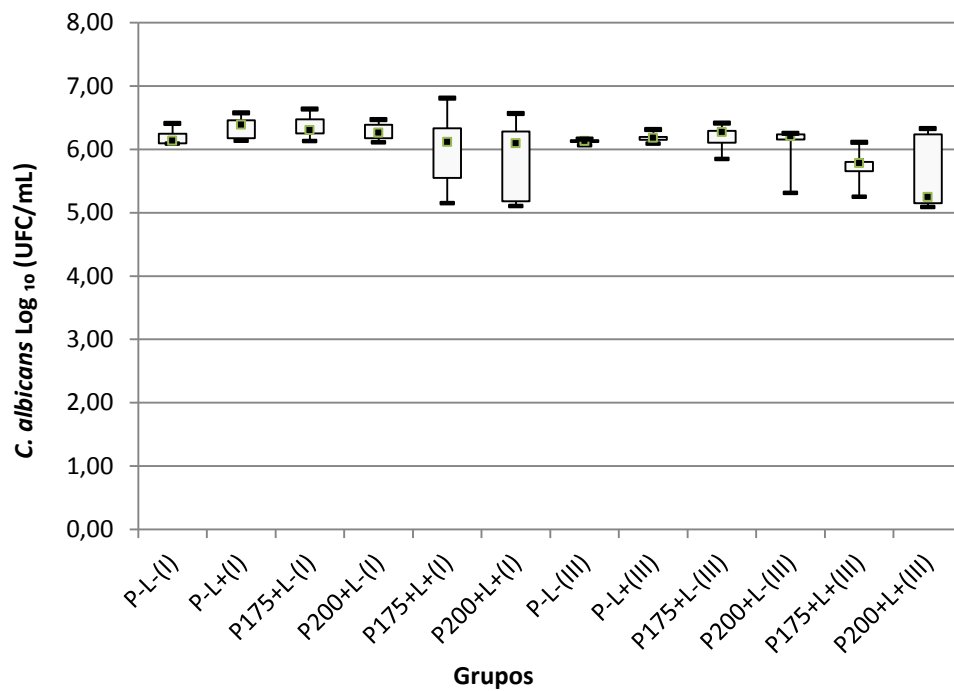


Figura 20 - Gráfico Box-plot da variabilidade de *C. glabrata* em Log₁₀ (UFC / mL) dos biofilmes submetidos a uma ou três aplicações de PDT.

* significa diferença significativa em relação ao controle P-L-(I); § significa diferença significativa em relação ao controle P-L-(III).

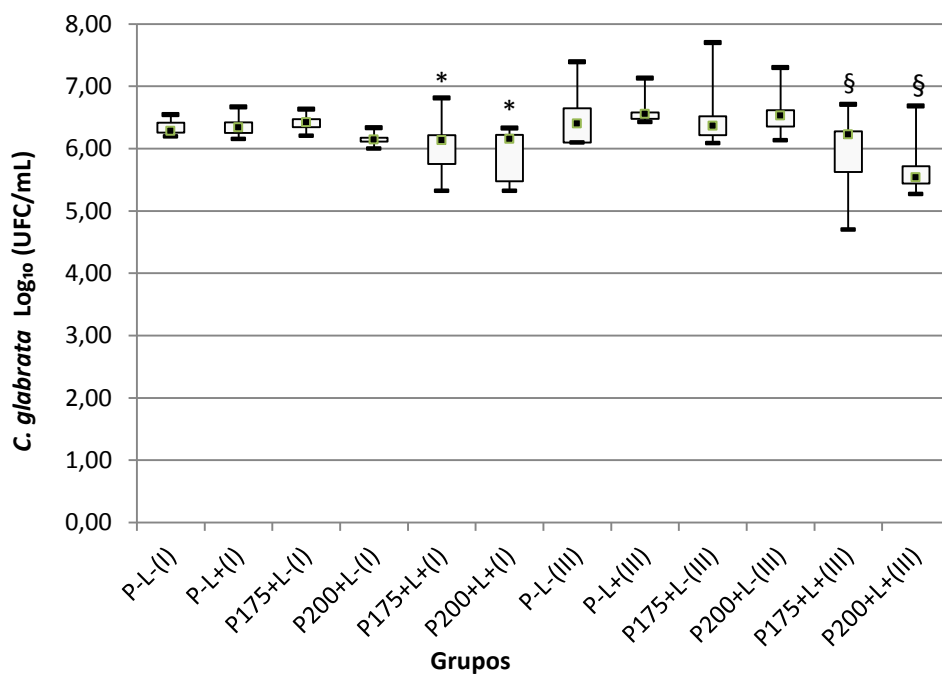
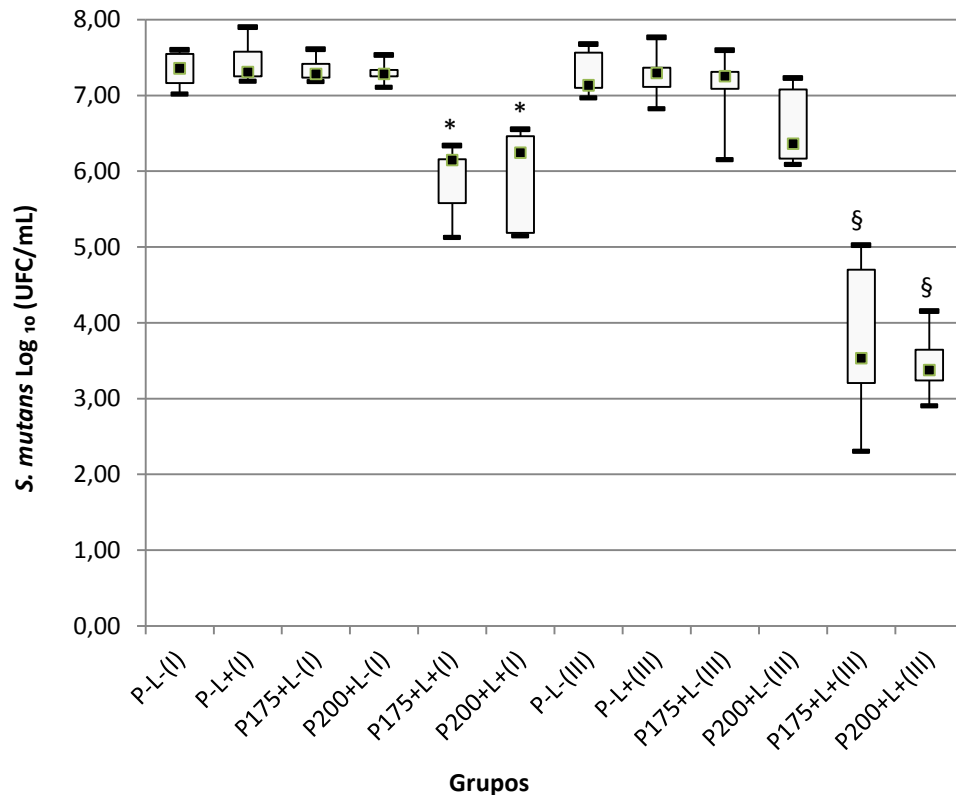


Figura 21 - Gráfico Box-plot da variabilidade de *S. mutans* em Log_{10} (UFC / mL) dos biofilmes submetidos a uma ou três aplicações de PDT. * significa diferença significativa em relação ao controle P-L-(I); § significa diferença significativa em relação ao controle P-L-(III).

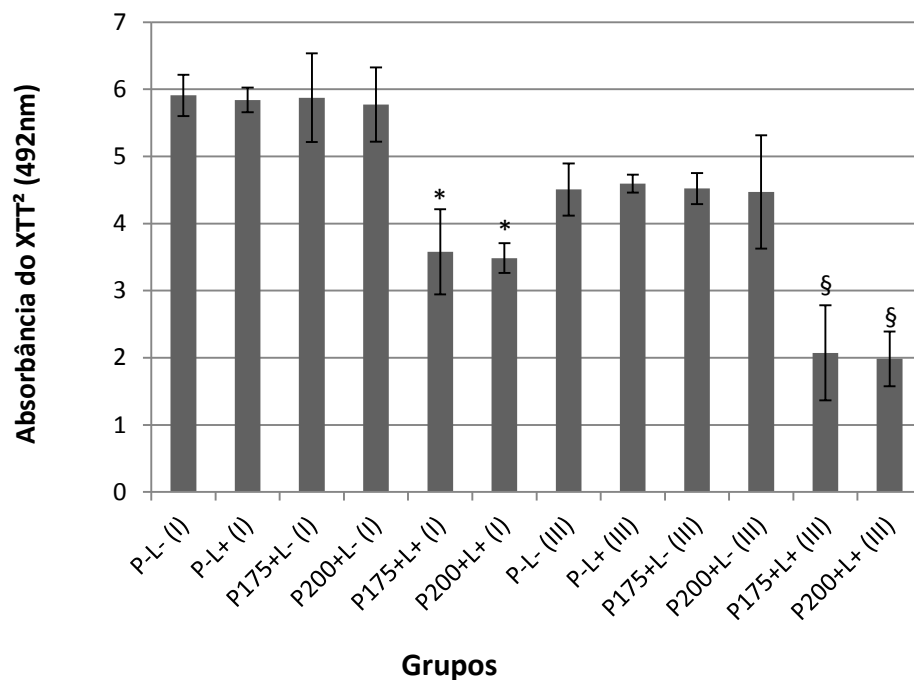


5.2.2 Análise quantitativa do teste de redução do XTT

Para a análise estatística da atividade metabólica do biofilme, utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. A Figura 22 representa as médias e o desvio padrão da absorbância obtido por meio do ensaio de redução de XTT. Para melhorar as condições de normalidade e homogeneidade da variância, os dados obtidos no teste de XTT foram elevados ao quadrado (XTT^2). Desta forma, foi obtida a homogeneidade de variância. Como a ANOVA é robusta para os desvios de normalidade, mantivemos a utilização de testes paramétricos. Para a análise estatística foi considerado nível de significância de 5%. Assim, foi utilizado ANOVA para duas variáveis, seguido do teste post-hoc de Tukey.

Para o ensaio XTT o teste de Tukey demonstrou que, quando realizadas uma ou três aplicações de PDT (P+L+(I) ou P+L+(III)) mediada por ambas as concentrações de PDZ foi observada uma redução significativa ($P < 0,05$) na atividade metabólica do biofilme presente nos corpos-de-prova de resina acrílica, quando comparado aos seus respectivos grupos controles ((P-L- (I), P-L+ (I) e P+L- (I) e ((P-L- (III), P-L+ (III) e P+L-(III)). A utilização das concentrações (175 e 200 mg/L) de PDZ não apresentaram diferenças significativa ($P > 0,05$) entre si para uma e três aplicações. Também não foi observado diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controles P-L-, P-L+ e P+L-, para uma e três aplicações. Além disso, foi verificado que uma aplicação de PDT foi significativamente diferente de três aplicações para ambas as concentrações ($P < 0,05$)(Figura 22).

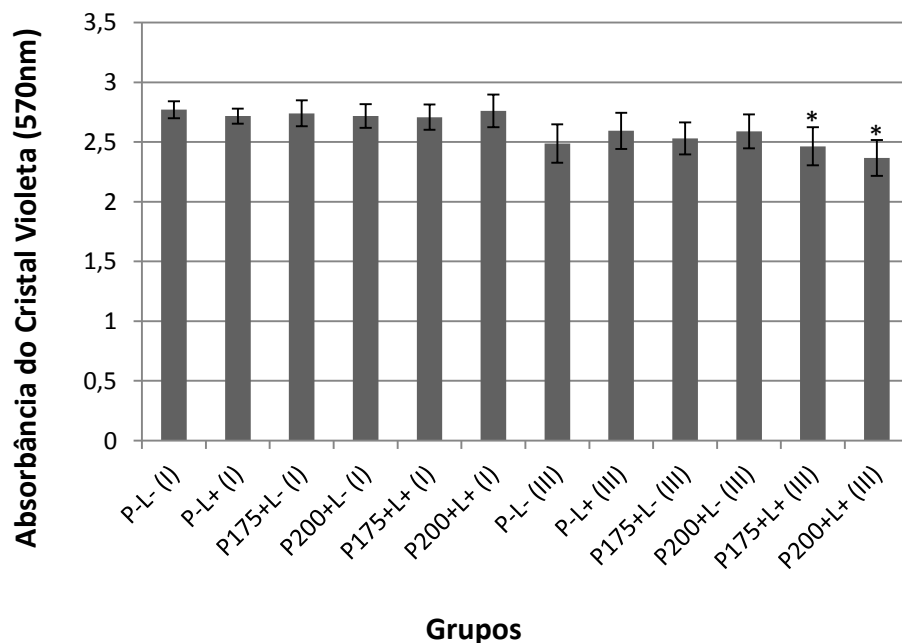
Figuras 22 - Médias dos valores da atividade metabólica do biofilme multi-espécies (absorbância do ensaio do XTT no filtro de 492 nm) formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica, para uma e três aplicações de PDT. Barras de erro: desvio padrão. * significa diferença significativa em relação ao controle P-L-(I); § significa diferença significativa em relação ao controle P-L-(III).



5.2.3 Análise quantitativa da biomassa total do biofilme (coloração cristal violeta)

Para a análise estatística da biomassa total do biofilme utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. Quando a PDT foi realizada uma vez, ANOVA não mostrou diferença significativa ($P > 0,05$) dos valores obtidos no teste de biomassa total entre os grupos (P+L+, P-L-, P+L- e P-L+). Quando foram realizadas três aplicações de PDT o teste de Tukey verificou diferença significativa ($P < 0,05$) na biomassa total dos biofilmes submetidos a PDT com 200 mg/L de PDZ, em comparação com os grupos P-L+ e P+L- (200 mg /L de PDZ). Quando comparadas uma e três aplicações sucessivas de PDT, o teste de Tukey revelou redução significativa ($P < 0,05$) na biomassa total do biofilme nas amostras submetidas a três aplicações de PDT, em comparação a apenas uma aplicação para ambas às concentrações PDZ (175 e 200 mg/mL) (Figura 23).

Figuras 23 - Médias dos valores do ensaio da biomassa total (CV) do biofilme multi-espécies (absorbância do ensaio de Biomassa Total no filtro de 570nm), formado sobre corpo-de-prova de resina, para uma e três aplicações de PDT. Barra de erros: desvio padrão. * significa diferença significativa para três aplicações de PDT em relação a uma aplicação de PDT para ambas as concentrações.



5.2.4 Análise do biofilme por microscopia confocal de varredura laser (MCVL)

A viabilidade e arranjo espacial do biofilme multi-espécies composto por *C. albicans*, *S. mutans* e *C. glabrata* foram observadas por MCVL. Os biofilmes foram cultivados sobre corpos-de-prova de resina acrílica e marcados com os fluorocromos (SYTO-9 e PI) do kit BacLight Live/Dead e em seguida foram obtidas as imagens pelo MCVL. As imagens obtidas a partir da MCVL (Figuras 24 e 25) mostram que após uma e três aplicações consecutivas de PDT (P200+L+ (I) e P200+L+(III)) (Figura 24 c, d e Figura 25 c,d) sobre o biofilme multi-espécies formado sobre corpos-de-prova de resina houve aumento visual do número de células marcadas com fluorescência vermelha indicando dano da célula microbiana, quando comparado aos seus respectivos controles P-L- (I) e P-L- (III) (Figura 24 a,b e Figura 25a,b). Além disso, no grupo P200+L+ (III), apresentado nas Figuras 25c, d, foi verificado aumento de *S. mutans* marcado com fluorescência vermelha. A secção transversal dos biofilmes mostrou espessura de 18,2 µm, 17µm, 19µm e 17 µm, nas Figuras 24 c, d, e Figura 25 c,d, respectivamente.

Figura 24 - Biofilmes multi-espécies foram marcados com os fluorocromos SYTO-9 e PI e foram obtidas as imagens por MCVL. Os micro-organismos em vermelho foram considerados mortos (PI), enquanto que os micro-organismos em verde foram considerados vivos (SYTO-9). (a) Imagem do grupo de controle positivo (P-L(I)). (b) Secção transversal e vista lateral do grupo P-L(I), espessura de 18,2 μm do biofilme (linha amarela). (c) imagem do biofilme após uma aplicação de PDT, grupo P200+L+(I) (PDZ (200 mg/mL) associado a luz LED na dose de 37,5 J/cm²). (d) Secção transversal e vista lateral do biofilme após uma aplicação da PDT (PDZ (200mg/mL) associado à luz LED na dose de 37,5 J/cm²) e espessura de 17,0 μm (linha amarela).

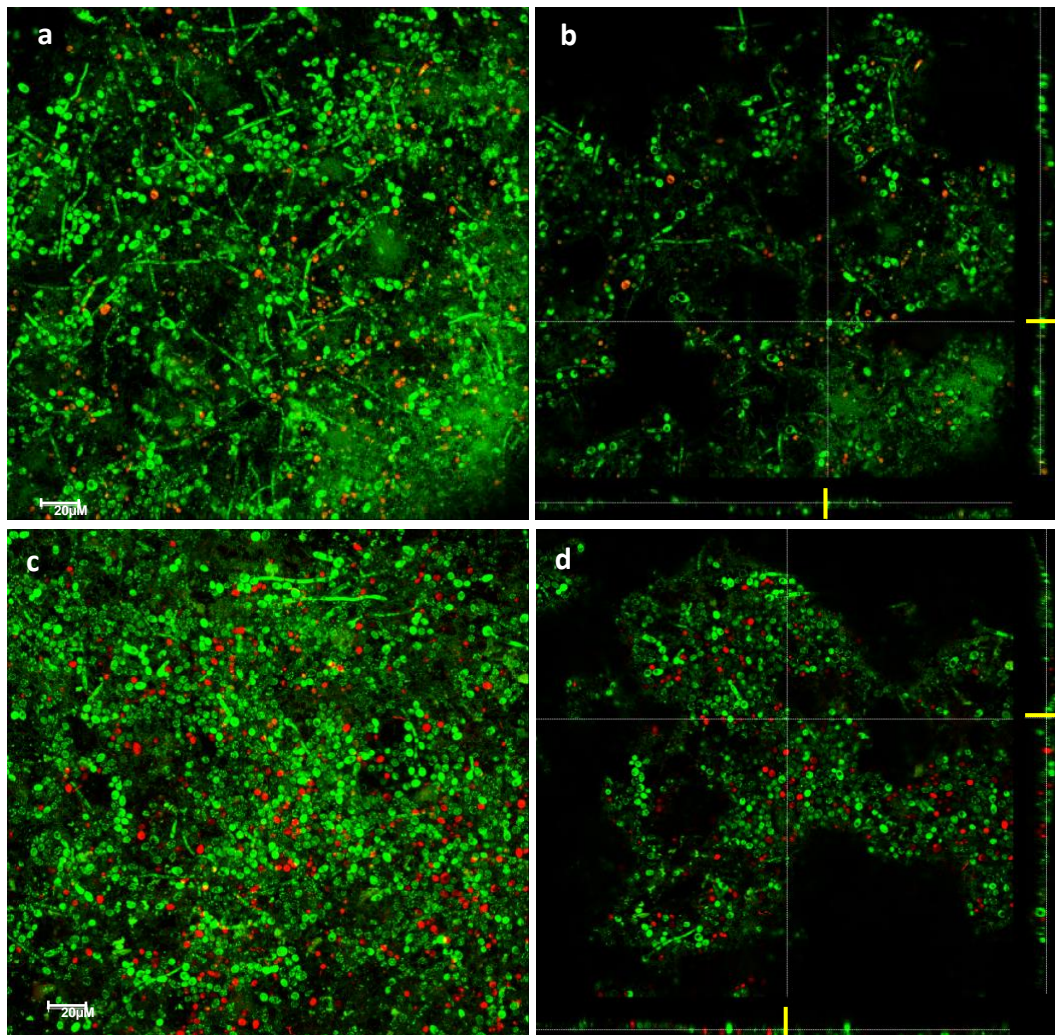
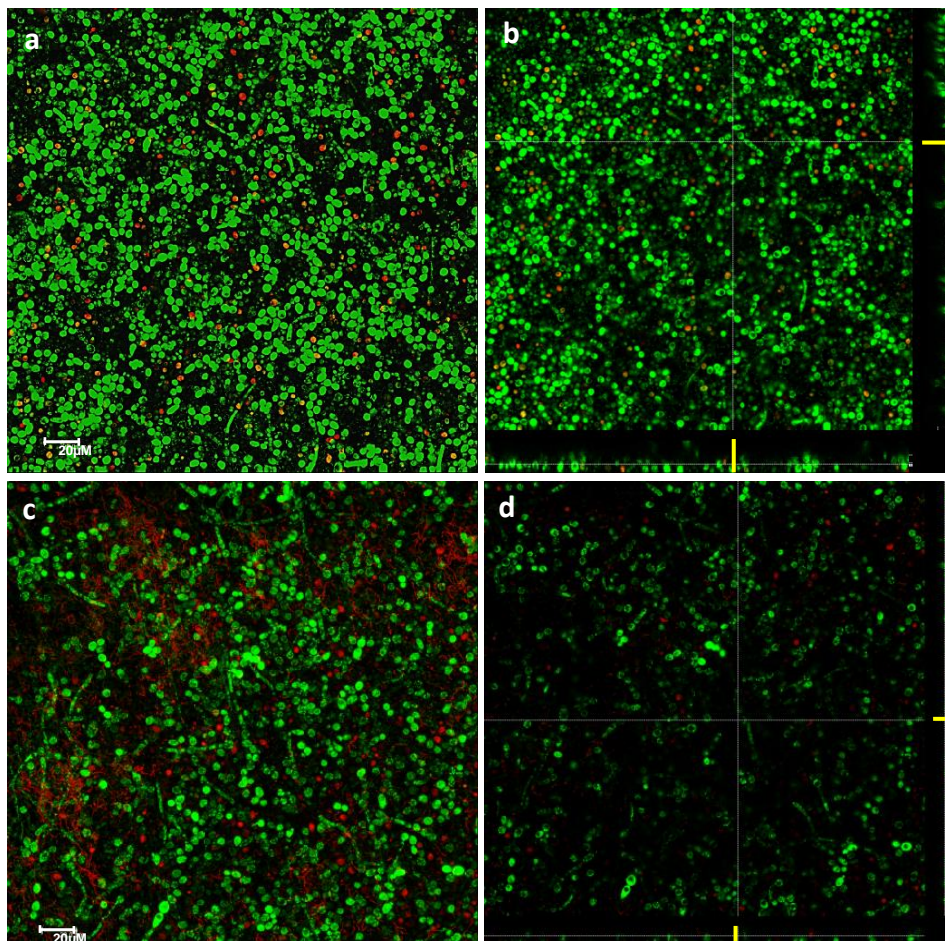


Figura 25 - Biofilmes, multi-espécies, marcados com os fluorocromos SYTO-9 e PI e obtenção das imagens por MCVL. Os micro-organismos em vermelho foram considerados mortos (PI), enquanto que os micro-organismos em verde foram considerados vivos (SYTO-9). (a) Imagem do grupo de controle positivo (P-L-(III)). (b) Secção transversal e vista lateral do grupo controle P-L-(III), espessura de 19 μ m do biofilme - (linha amarela). (c) imagens de biofilmes após três aplicações da PDT, grupo P200+L+ (III) (PDZ (200mg/mL) associado à luz LED na dose de 37,5 J/cm²). (d) Secção transversal e vista lateral após três aplicações da PDT (PDZ (200mg/mL) associado à luz LED na dose de 37,5 J/cm²), e espessura de 17,0 μ m (linha amarela).



5.3 Resultados da Avaliação da Eficácia de Diferentes Concentrações do FS Cur (80, 100 E 120µm) Associada e Luz LED (455nm) Sobre Biofilmes Multi-Espécies Cultivados por Diferentes Períodos (24 E 48h) Sobre Amostras de Resina Acrílica (Apêndice 3).

5.3.1 Análise quantitativa da viabilidade do biofilme (UFC/mL)

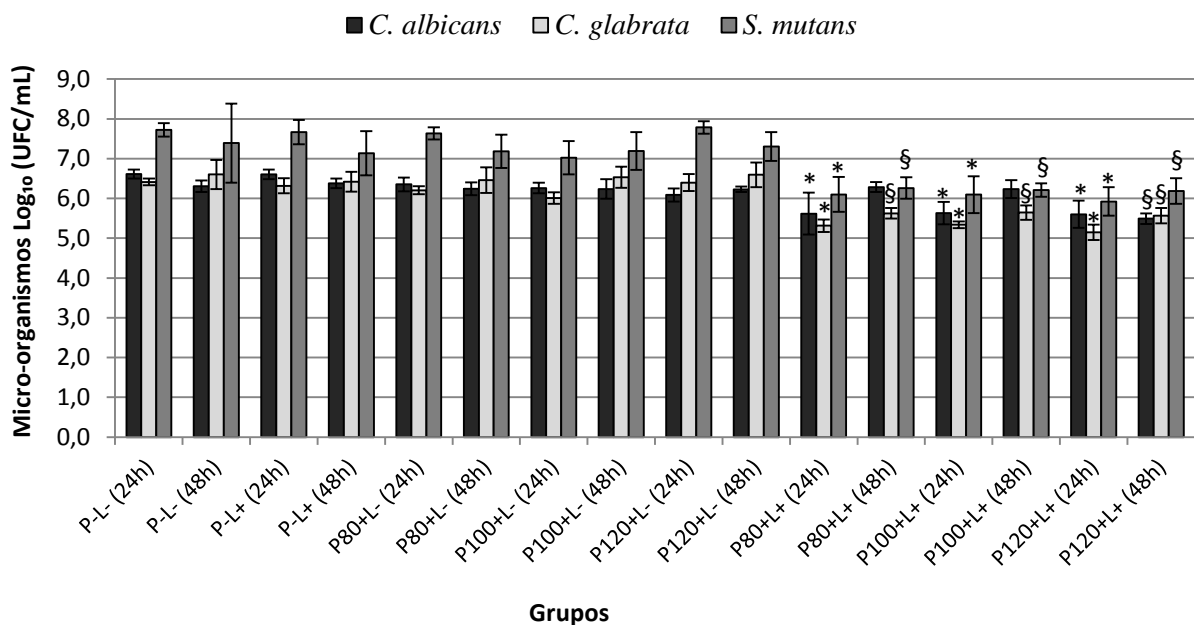
Para a análise estatística da viabilidade das espécies microbianas presentes no biofilme, os valores de UFC/mL foram transformados em valores de logaritmo (\log_{10}) e utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey.

De acordo com o teste post-hoc de Tukey, quando o biofilme multi-espécies foi formado por 24 horas sobre amostra de resina acrílica, os micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) para os valores de Log_{10} (UFC/mL) quando as amostras foram submetidas a PDT (P80+L+ (24h), P100+L+ (24h) e P120+L+ (24h)) quando comparado ao grupo controle positivo (P-L- (24h)). Entretanto, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para os grupos PDT entre as diferentes concentrações (80, 100 e 120 µM). Além disso, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle P-L- (24h), P-L+ (24h), P80+L-(24h), P100+L-(24h). Entretanto, o grupo controle P120+L-(24h), foi significativamente diferente ($P < 0,05$) para os três micro-organismos avaliados quando comparados aos demais grupos controle.

Quando o biofilme foi formado por 48hs sobre amostra de resina acrílica, para *C. albicans* o grupo P120+L+(48h) foi o único a apresentar diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (P-L-(48h)). Não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle P-L- (48h), P-L+(48h), P80+L- (48h), P100+L- (48h) e P120+L- (48h). Para os micro-organismos *C. glabrata* e *S. mutans* foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) para os valores de Log_{10} (UFC/mL) para as aplicações de PDT (P80+L+(48h), P100+L+(48h) e P120+L+(48h)) quando comparado ao grupo controle positivo (P-L-(48h)). Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos PDT mediada pelas diferentes concentrações (80, 100 e 120µM) de Cur. Também não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle P-L-(48h), P-L+(48h), P80+L-(48h),

P100+L-(48h) e P120+L-(48h). Os resultados de UFC/mL obtidos para os biofilmes formados por 24 e 48 horas para os micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* estão representados na Figura 26.

Figura 26 - Médias dos valores da viabilidade celular em Log₁₀ (UFC/mL) de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* para os biofilmes de 24 e 48 horas. Barras de erro: desvio padrão. * significa diferença significativa dos grupos PDT para o biofilme de 24h comparado ao seu controle (P-L- (24h)); § significa diferença estatística entre os grupos PDT para o biofilme de 48h comparado ao seu controle (P-L- (48h)).



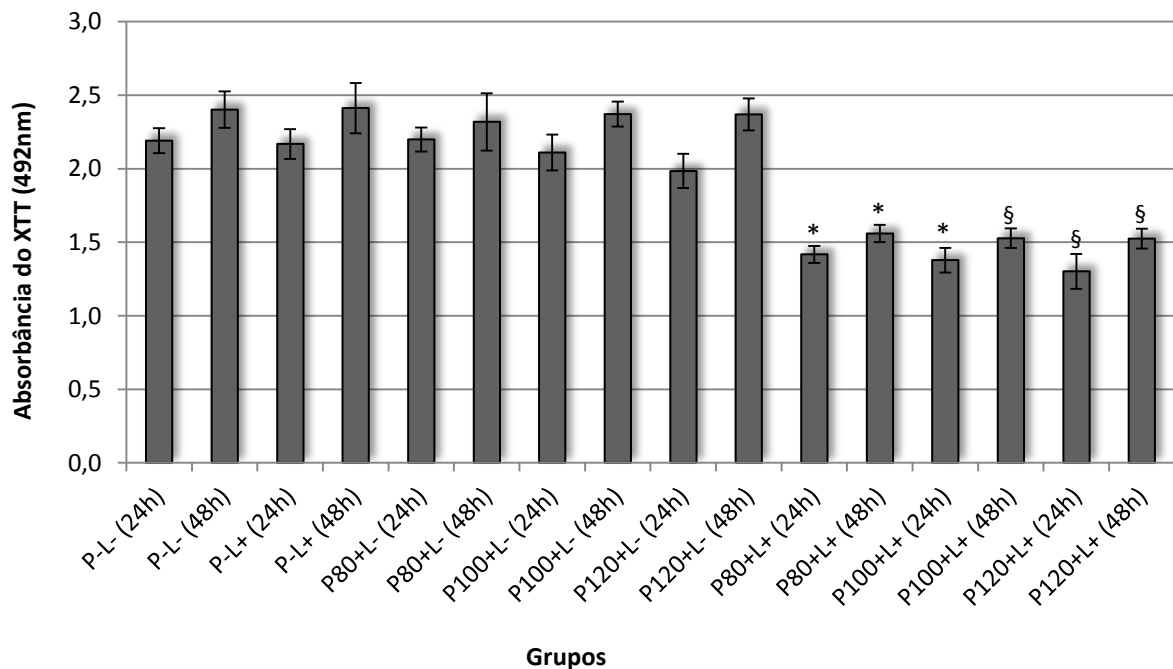
5.3.2 Análise quantitativa do teste de redução do XTT

Para a análise estatística da atividade metabólica do biofilme (XTT), utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. O teste de Tukey demonstrou que, quando o biofilme foi formado por 24 h sobre as amostras de resina, a aplicação da PDT mediada pelas três concentrações de Cur promoveu redução significativa ($P < 0,05$) na atividade metabólica do biofilme, quando comparado ao grupo controle (P-L- (24h)). Além disso, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controles P-L-(24h), P-L+(24h) e

P+L-(24h), exceto para o grupo controle P120+L-(24h) que apresentou diferença estatística quando comparada aos demais grupos controles.

Quando o biofilme foi formado por 48h, o teste de Tukey demonstrou que, os três grupos PDT foram eficazes para promover redução significativa ($P < 0,05$) na atividade metabólica do biofilme presente nos corpos-de-prova de resina acrílica, quando comparado ao grupo controle (P-L-(48h)), e não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos PDT. Também não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controles (P-L-(48h), P-L+(48h), P80+L-(48h), P100+L-(48h) e P120+L-(48h)) (Figura 27).

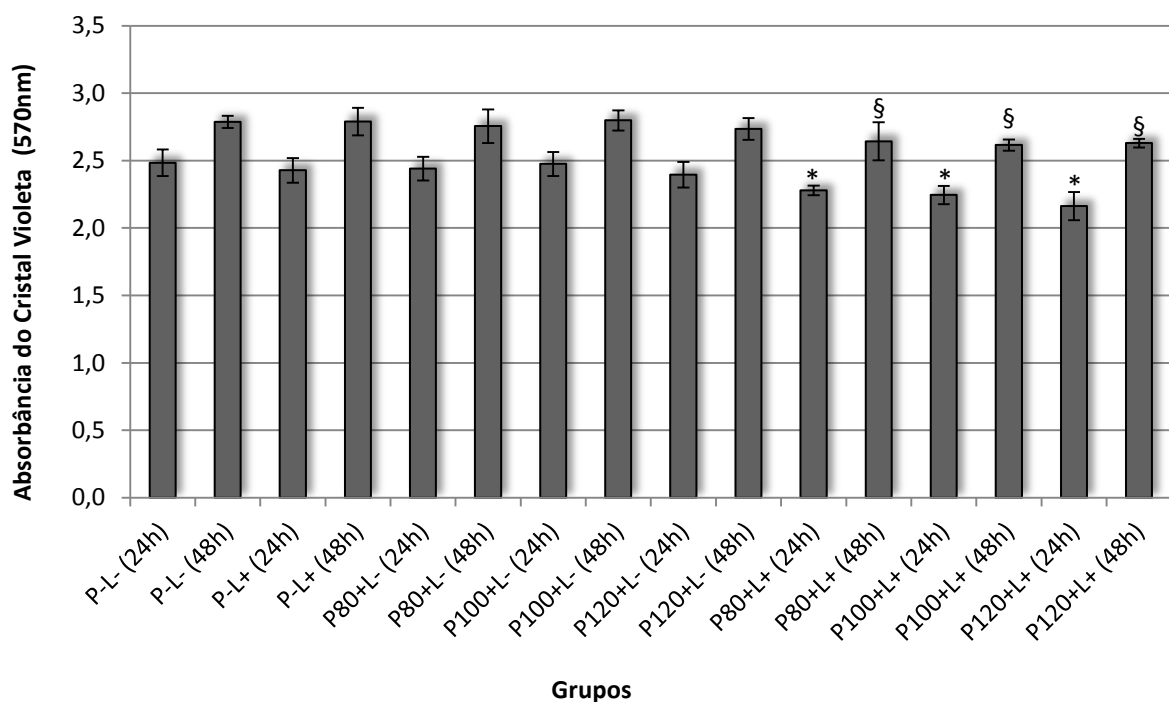
Figura 27- Médias dos valores da absorbância do ensaio do XTT (filtro de 492 nm) para os biofilmes formados por 24 e 48 horas. Barras de erro: desvio padrão. * significa diferença significativa dos grupos PDT para o biofilme de 24h comparado ao seu controle (P-L- (24h)); § significa diferença estatística entre os grupos PDT para o biofilme de 48h comparado ao seu controle (P-L- (48h)).



5.3.3 Análise quantitativa da biomassa total do biofilme (coloração cristal violeta)

Para a análise estatística da biomassa total do biofilme utilizou-se o teste estatístico de ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. Quando a PDT foi realizada para os biofilmes formados por 24 e 48 horas, o teste de Tukey mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores obtidos no teste de biomassa total entre os grupos PDT (P80+L+ (24h) P100+L+ (24h) P120+L+ (24h), P+L+ (48h), P100+L+ (48h), P120+L+ (48h)), e seus respectivos grupos controle ((P-L- (24h) e P-L- (48h)). Além disso, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos PDT mediada pelas diferentes concentrações de Cur (80, 100 e 120 μ M), tanto para o biofilme de 24, quanto para o biofilme de 48 horas. Também, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controles (P-L- (24h), P+L-(24h) e P-L+(24h)) e (P-L-(48h), P+L-(48h) e P-L+(48h)) (Figura 28).

Figuras 28- Médias dos valores da absorbância do ensaio da Biomassa total (CV - filtro de 570nm) para os biofilmes formados por 24 e 48 horas. Barras de erro: desvio padrão. * significa diferença significativa dos grupos PDT para o biofilme de 24h comparado ao seu controle (P-L- (24h)); § significa diferença estatística entre os grupos PDT para o biofilme de 48h comparado ao seu controle (P-L- (48h)).



5.3.4 Análise do biofilme por Microscopia Confocal de Varredura Laser (MCVL)

A viabilidade e arranjo espacial do biofilme multi-espécies composto por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* foi avaliado por MCVL. Os biofilmes foram cultivados sobre corpos-de-prova de resina acrílica e marcados com os fluorocromos (SYTO-9 e PI) do kit BacLight Live/Dead e em seguida foram obtidas as imagens pelo MCVL. As imagens obtidas a partir da MCVL (Figura 29 e 30) mostram que após as aplicações de PDT mediada por Cur (P120+L+ (24h) e P120+L+(48h)) (Figura 29 e Figura 30 c) sobre o biofilme multi-espécies de 24 e 48 horas, formado sobre corpos-de-prova de resina, houve aumento visual do número de células marcadas com fluorescência vermelha indicando dano da célula microbiana, quando comparado aos seus respectivos controles P-L- (24h) e P-L- (48h) (Figuras 29 a, Figura 30 a). Além disso, foi observado que no grupo P120+L- (24h), apresentado na Figuras 29 c, houve aumento visual de células com fluorescência vermelha quando comparado ao grupo P-L- (24h). A secção transversal dos biofilmes mostrou espessura de 20µm, 19µm, 17 µm, 23,5 µm e 22 µm, referente aos grupos P-L- (24h), P120+L- (24h), P120+L+ (24h), P-L- (48h) e P120+L+(48h), respectivamente (Figura 29b, d, f; Figura 30b,d).

Figura 29 – Os biofilmes multi-espécies foram marcados com os fluorocromos SYTO-9 e PI e foram obtidas as imagens por MCVL. Os micro-organismos em vermelho foram considerados mortos (PI), e os micro-organismos em verde foram considerados vivos (SYTO-9). (a) Imagem do grupo de controle positivo (P-L-(24h)). (b) Secção transversal e vista lateral do grupo P-L-(24h), espessura de 20 μ m do biofilme (linha amarela). (c) Imagem do biofilme após exposição à Cur (120 μ M) na ausência de luz LED (P120+L-(24h)). (d) Secção transversal e vista lateral do biofilme exposto à Cur (120 μ M) na ausência de luz LED e espessura de 19,0 μ m (linha amarela). (e) Imagem do biofilme de 24 horas após a aplicação de PDT (Cur (120 μ M) associado à luz LED na dose de 37,5 J/cm²). (f) Secção transversal e vista lateral do biofilme de 24 horas após a PDT (P120+L+(24h)) e espessura de 17 μ m do biofilme (linha amarela).

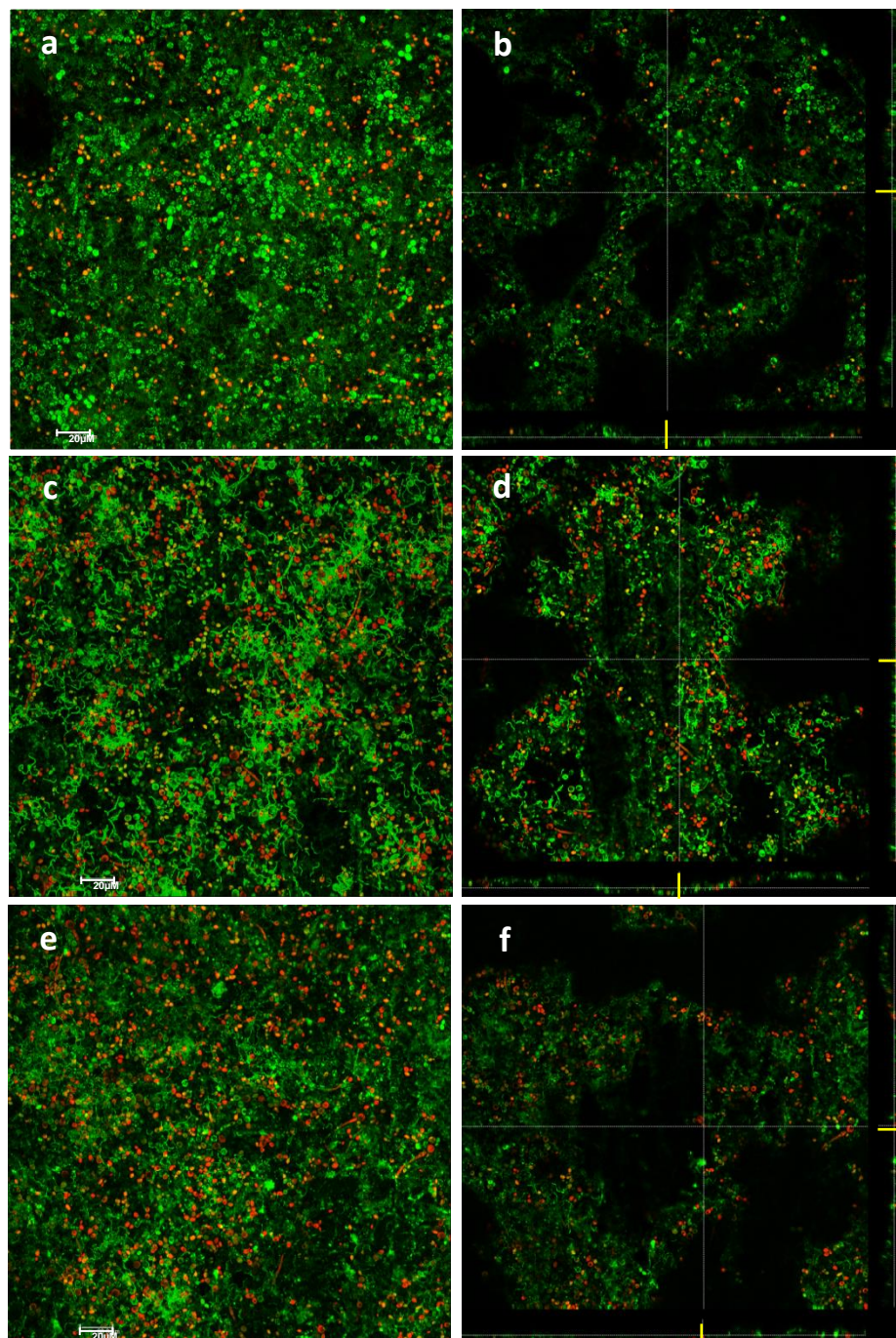
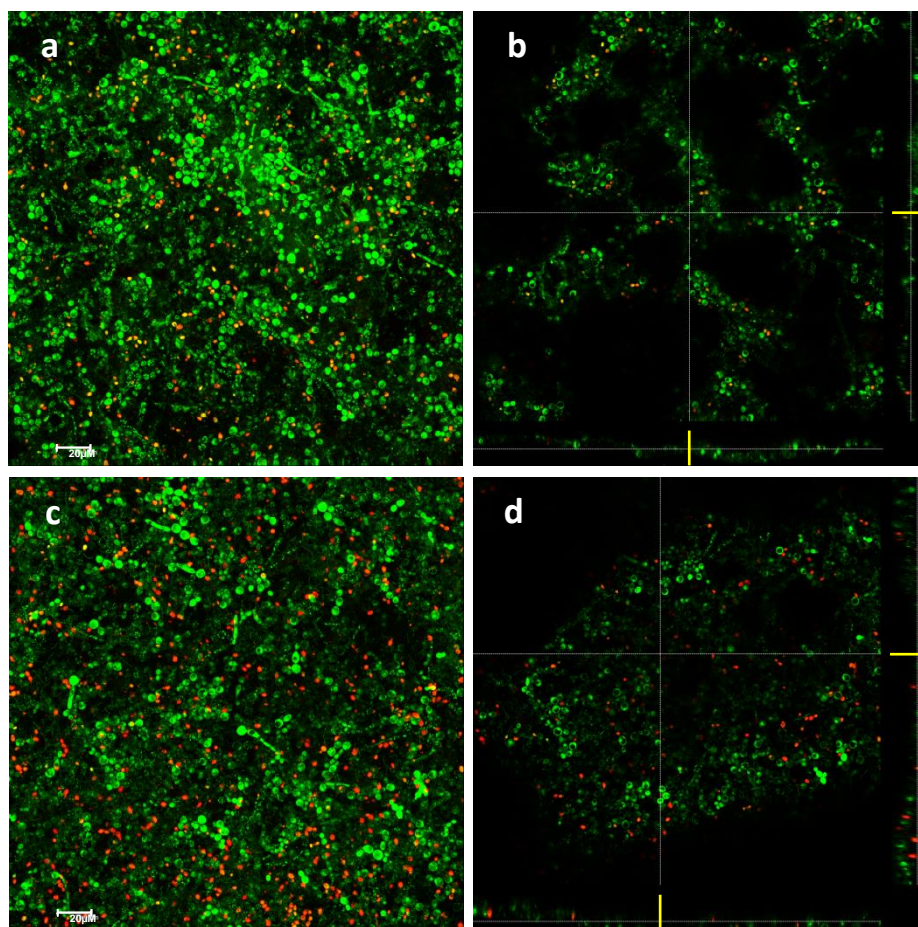


Figura 30 – Os biofilmes multi-espécies foram marcados com os fluorocromos SYTO-9 e PI e foram obtidas as imagens por MCVL. Os micro-organismos em vermelho foram considerados mortos (PI), e os micro-organismos em verde foram considerados vivos (SYTO-9). (a) Imagem do grupo de controle positivo (P-L-(48h)). (b) Secção transversal e vista lateral do grupo P-L-(48h), espessura de 23,5 μ m do biofilme - (linha amarela). (c) Imagem do biofilme de 48 horas após a aplicação de PDT (Cur na concentração de 120 μ M associado à luz LED na dose de 37,5 J/cm²). (d) Secção transversal e vista lateral do biofilme de 48 horas após a PDT (P120+L+(48h)) e espessura de 22 μ m do biofilme - (linha amarela).



Discussão

6 DISCUSSÃO

A capacidade de aderência dos micro-organismos a diferentes superfícies, bem como a interação entre as espécies, são mecanismos que visam garantir a sobrevivência e a proliferação dos mesmos, acarretando muitas vezes em menor susceptibilidade dos patógenos aos tratamentos e aos procedimentos de desinfecção. Neste estudo foi avaliado o efeito antimicrobiano da PDT mediada pelos fotossensibilizadores PDZ e Cur, associados à luz LED sobre o biofilme multi-espécies, composto por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. Para a análise do biofilme foram avaliadas as variáveis: viabilidade celular, a atividade metabólica, a biomassa total e a morte e vida dos micro-organismos, por meio dos testes de quantificação de colônias (UFC/mL), ensaio XTT, coloração CV e obtenção de imagens por MCVL (kit LIVE/DEAD[®]), respectivamente. Quanto aos ensaios utilizados, o método convencional de contagem de colônia (UFC/ml) tem sido considerado padrão ouro, entretando é considerado trabalhoso e lento, além disso, requer o rompimento do biofilme para a realização das diluições seriadas e posteriormente o plaqueamento em meio de cultura, o que pode afetar a viabilidade celular. Assim outras formas de análise, têm sido descritas para a quantificação do biofilme. O ensaio de XTT mede a atividade metabólica das células, contudo, não enumera a quantidade total de células. Além disso, como os micro-organismos presentes no biofilme podem ter acesso restrito aos nutrientes e ao oxigênio, isto pode alterar a sua atividade metabólica momentânea. A coloração CV é outra técnica que tem sido utilizada para a quantificação da biomassa total do biofilme, uma vez que são coradas as células vivas, mortas e a matriz do biofilme.

Os resultados da análise da eficácia da PDT mediada por diferentes concentrações de PDZ associada à luz LED na inativação de biofilme multi-espécies formado em fundo de placa de 96 orifícios, mostraram que para o teste de UFC a associação de 175 e 200 mg/L de PDZ com luz LED foi capaz de reduzir significativamente a contagem de colônias viáveis dos três micro-organismos, quando comparado com o grupo de controle positivo (P-L-). Embora, não houve diferença estatística entre os grupos que se usaram 175 ou 200mg/L de PDZ, a concentração de 200 mg/L promoveu a maior redução na viabilidade das células, sendo 1,21 log₁₀ para a *C. albicans*, 1,19 log₁₀ para a *C. glabrata* e 2,39 log₁₀ para o *S. mutans*. Para o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a eficácia da PDT

mediada PDZ em biofilme polimicrobiano, dessa forma, não é possível realizarmos uma comparação direta com os dados atualmente disponíveis. Alguns estudos avaliaram um derivado de clorina e6 na fotoinativação microbiana, e os resultados mostraram efetiva fotoinativação sobre as culturas planctônicas^{64,66}. Strakhovskaia et al.⁶⁶ verificaram que a cultura planctônica de *C. guilliermondii* foi 1,6 a 1,7 mais fotossensível do que a cultura de *C. albicans* utilizando-se o PDZ. Quando biofilmes de *Streptococcus pyogenes* cultivados em membranas foram sensibilizados por Sn (IV) clorina e6 e expostos a luz laser de um microscópio confocal, observou-se um aumento progressivo da morte celular em tempo real²⁷. No tratamento endodôntico, a PDT mediada por clorina e6 e laser de baixa potência, resultou na redução de 95% da bioluminescência de *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* quando aplicado isoladamente, e promoveu redução de 98% da bioluminescência quando associado ao tratamento endodôntico convencional. Além disso, a associação da PDT ao tratamento convencional resultou em menor quantidade de regeneração bacteriana após 24 horas da realização do tratamento²².

Outras investigações também verificaram uma redução significativa da viabilidade das células do biofilme multi-espécies após a PDT. Reduções 1,00-2,44 log₁₀ foram encontradas quando os biofilmes de duas ou três espécies de *S. mutans*, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* foram tratados com azul de metileno e laser⁵¹. No estudo realizado por Teixeira et al.⁶⁷, apesar de ter sido obtido redução significativa do biofilme mono-espécie de *S. mutans in vitro*, nenhum efeito significativo foi encontrado na viabilidade *Streptococcus total* e *S. mutans* em biofilme multi-espécies *in situ* tratados com azul de toluidina e luz LED. Quando um modelo de biofilme cariogênico *in vitro* de seis espécies (*Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis* e *C. albicans*) foi cultivado em discos de esmalte bovino e submetido a PDT (azul de metileno e luz laser), não houve diferença significativa em comparação ao controle (sem tratamento), com apenas um efeito mínimo sobre a viabilidade das células do biofilme (menos que 1 log₁₀)⁴⁴. Os resultados destes estudos mostram que biofilmes de múltiplas espécies são menos susceptíveis à PDT, e esta descoberta tem sido associada com a resistência mais elevada de células microbianas, quando organizadas em biofilme, e também com a proteção às células promovida pela matriz extracelular polimérica, que atua como uma barreira dificultando a penetração FS.

No que diz respeito aos dados obtidos no presente estudo, é importante salientar que a PDT foi mais eficaz na redução da viabilidade da bactéria do que de células fúngicas. Da mesma forma, Pereira et al.⁵¹ avaliaram a eficácia do PDT mediada por azul de metileno na inativação de biofilmes de uma, duas e três espécies, compostos por *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *S. mutans*. Os resultados mostraram que *S. aureus* e *S. mutans* foram mais susceptíveis à PDT quando comparado à *C. albicans* em biofilmes mono espécies e mistos. A vulnerabilidade dos micro-organismos à PDT pode ser devido às diferenças estruturais entre as células bacterianas e fúngicas¹⁷. Parece que a presença da membrana nuclear da célula eucariótica pode funcionar como uma barreira adicional para a penetração do FS e para as espécies reativas de oxigênio geradas após a PDT. Além disso, o tamanho/volume das células de *C. albicans* é de 25-50 vezes maior do que as células bacterianas⁷⁸. Essas características resultam na necessidade de uma maior quantidade de oxigênio singlete por célula para inativar as células de levedura^{17,78}. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a maior dificuldade na inativação das espécies fúngicas quando comparado à espécie bacteriana.

Neste estudo, o ensaio de redução de XTT foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da PDT no biofilme multi-espécies imediatamente após aplicação. Uma vez que o método do XTT não é capaz de avaliar o efeito do tratamento sobre o metabolismo celular de cada uma das espécies envolvidas, este teste foi realizado como um teste complementar para avaliar a eficácia da PDT. A utilização do ensaio de redução do XTT é fortemente correlacionada com outras técnicas quantitativas, como a quantificação de colônias UFC⁵⁰. O ensaio do XTT tem sido amplamente usado para estudar o comportamento de células microbianas em biofilmes mono-espécie^{3,18,56}. Além disso, ao contrário do método de quantificação de colônias, no ensaio de XTT o biofilme é avaliado de forma intacta, isto é, não é realizada ruptura mecânica no biofilme depois de executada as condições experimentais. Os resultados obtidos no presente estudo demonstrou uma redução significativa na atividade metabólica do biofilme em concentrações de 100, 150, 175 e 200 mg/L, quando comparado com o grupo controle positivo (P-L-). Contudo não houve diferença significativa entre estas concentrações. O valor médio da redução da atividade metabólica de biofilme foi equivalente a 36,4%. Anteriormente, alguns estudos avaliaram a eficácia da PDT contra as bactérias^{39,57} e leveduras^{3,18,19} em

biofilme mono-espécie e seus homólogos planctônicos usando o método de XTT. Quando a Curcumina foi utilizada como FS, a atividade metabólica de *Candida albicans* em biofilme mono-espécie foi proporcional à concentração do FS³ e uma redução significativa na atividade metabólica de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* em biofilme mono-espécie foi observada após o aumento do tempo de incubação com o FS¹⁸.

O modelo de biofilme empregado neste estudo também foi avaliado através da quantificação de biomassa total por coloração CV. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre todos os grupos avaliados, quando comparado com o grupo controle positivo (P-L-). Esta conclusão contrasta com as outras avaliações realizadas no presente estudo, no qual foi verificada uma redução significativa da viabilidade e metabolismo celular após PDT. A inexistência de uma diferença significativa na biomassa total entre os grupos avaliados pode ser atribuída à coloração da matriz, bem como de ambas as células vivas e mortas dentro do biofilme. Na investigação realizada por Pathak et al.⁴⁹ (2012) foi verificado, por meio do ensaio de CV, o potencial de formação de biofilme por múltiplas espécies de *Candida*, e os resultados mostraram que a associação de *C. albicans* e *C. glabrata* exibiu maior de produção de biofilme, enquanto que *C. tropicalis* dificultou a produção de biofilme quando associadas a outras espécies de *Candida* não-albicans. Além disso, de acordo com Silva et al.⁶² (2009), o biofilme de *C. glabrata* apresenta um elevado teor de hidratos de carbono e proteínas, que são mais susceptíveis em absorver o corante CV. Deste modo, podemos sugerir que, apesar da PDT promover uma redução significativa na viabilidade das células e no metabolismo celular, este não foi suficiente para promover diferença estatística significativa na biomassa total após PDT, provavelmente devido à composição e à elevada quantidade de biofilme produzido pela associação de *C. albicans* e a *C. glabrata*. Parece que a produção e interação da matriz polimérica produzida por diferentes micro-organismos resultam no aumento da viscosidade da matriz aumentando a resistência do biofilme multi-espécies aos métodos de desinfecção⁶³. Além disso, de acordo com o estudo de Pereira-Cenci et al.⁵² (2008), existe sinergismo entre *C. albicans* e *C. glabrata*, e a presença de *S. mutans* aumenta o desenvolvimento de biofilme de *Candida spp.* e inibe a formação de hifas de *C. albicans*. Uma vez que as formas de levedura são menos susceptíveis a PDT que as formas de hifas⁸, pode ser sugerido que a presença de bactérias num biofilme multi-

espécies pode promover o aparecimento de características específicas que estabelecem menor susceptibilidade à PDT.

A análise por MCVL mostrou que, na ausência do SYTO-9 e PI, os micro-organismos não exibiram qualquer fluorescência. Assim, a presença de micro-organismos sobre os discos de poliestirenos pode ser observada pelo modo de transmissão. A utilização do kit de coloração LIVE/DEAD[®] permitiu avaliar a viabilidade ou não do biofilme após a PDT em comparação ao grupo controle (P-L-). Embora não tenha sido realizada a contagem dos micro-organismos presentes no biofilme multi-espécies, por meio da fluorescência verde ou vermelha, as imagens mostram que após tratamento com FS PDZ a 175 e 200 mg/mL associado a 37,5 J/cm², foi observado aumento visual das células coradas em vermelho, mostrando assim que os micro-organismos foram danificados pela aplicação da PDT quando comparado ao grupo controle (P-L-). Essas imagens complementam de forma ilustrativa os demais resultados obtidos pelos testes de UFC, XTT e biomassa total. Considerando os resultados obtidos, nesta primeira etapa do estudo, foi verificado que para uma única aplicação de PDT sobre biofilmes formados em fundo de placa de 96 orifícios, as concentrações do FS PDZ de 175 e 200mg/L associadas a 37,5 J/cm² resultaram na redução de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* presentes no biofilme multi-espécies.

Na segunda etapa deste estudo, foi avaliada a eficácia de aplicações sucessivas da PDT mediada pelo FS PDZ associada à luz LED na inativação de biofilme multi-espécies formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica. Para isso, foram selecionadas as concentrações de 175mg/L e 200mg/L que apresentaram maior efetividade na primeira etapa deste estudo. A utilização de múltiplas aplicações de PDT sobre o biofilme multi-espécies foi proposta pelo fato de ter sido demonstrado na literatura que a fotossensibilização letal dos micro-organismos submetidos a PDT ocorreram predominantemente nas camadas mais externas do biofilme⁵¹. Assim, aplicações sucessivas da PDT poderiam desestruturar o biofilme e permitir a penetração do FS nas camadas mais profundas potencializando a ação do tratamento. Os resultados mostraram que para o teste de UFC a associação de 175 e 200 mg/L de PDZ com luz LED foi capaz de reduzir significativamente a contagem de colônias viáveis de *C. glabrata* e *S. mutans*, quando comparado com o grupo de controle positivo (P-L-) para uma ou três aplicações de PDT. Além disso, para *S. mutans* foi verificada diferença significativa entre uma e três aplicações, sendo que

três aplicações sucessivas de PDT foram mais efetivas na redução na viabilidade das células. Contudo, não foi verificada diferença significativa entre as concentrações utilizadas.

Quando esses resultados foram comparados aos resultados obtidos na primeira etapa deste estudo, foi observado que, quando o biofilme multi-espécies foi formado em fundo de placa de poliestireno uma aplicação de PDT foi capaz de reduzir significativamente os três micro-organismos avaliados. No entanto, quando o biofilme multi-espécies foi formado sobre os corpos-de-prova de resina acrílica, para a espécie de *C. albicans* uma e três aplicações de PDT não foram capazes de reduzir a viabilidade deste fungo. Para a *C. glabrata*, foi observada redução significativa na viabilidade celular entre após a PDT quando comparada aos grupos controles. Embora não tenha sido observada diferença estatística entre uma e três aplicações de PDT, e entre as concentrações avaliadas, a maior redução obtida foi de 0,81 log₁₀ quando foram realizadas três aplicações de PDT mediada por 200mg/L de PDZ, enquanto que para o biofilme formado em fundo de placa de poliestireno foi observado que uma aplicação reduziu 1,19 log₁₀ para PDT mediada por 200mg/L de PDZ. Para *S. mutans*, quando realizada uma aplicação de PDT sobre o biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica, a maior redução foi de 1,46 log₁₀, enquanto que, em fundo de placa uma aplicação resultou na redução de 2,39 log₁₀. Entretanto, quando foram realizadas três aplicações de PDT, foi observada redução de 3,82 log₁₀ para a concentração de 200mg/L.

A diferença na redução de viabilidade celular observada nos biofilmes multi-espécies pode estar relacionado aos diferentes tipos de substratos nos quais os micro-organismos foram aderidos, uma vez que esses podem favorecer a proteção, proliferação e sobrevivência microbiana. A rugosidade da resina acrílica também favorece o aumento da retenção do biofilme e contribui para dificultar sua remoção^{70,79}. Além disso, os micro-organismos são capazes de penetrar na resina acrílica e sobreviver a uma profundidade que varia de 1,0 a 2,0 micrometros¹¹. Os fungos do gênero *Candida* apresentam grande afinidade ao acrílico^{43,46} e são capazes de aderir fortemente a resinas de base de prótese⁴⁵. Além disso, fatores como a hidrofobicidade da resina (forças de van der Waal e as forças electrostáticas) também interferem na aderência dos fungos^{32,72}. A característica hidrofóbica da superfície dos materiais aumenta à capacidade de colonização e forte ligação das formas de hifas de *C. albicans* as superfícies de próteses dentárias⁷⁶.

Adicionalmente a associação entre diferentes micro-organismos pode contribuir para o processo de colonização e adesão dos mesmos a diversos substratos. As espécies de *Candida* tem a habilidade de se aderir diretamente à superfície da prótese ou por meio da presença de uma camada bacteriana intermediária formada na base da prótese^{9,71}. Assim, a presença de bactéria contribui para a colonização e proliferação das cepas de *Candida*²⁹. No caso dos *Streptococcus mutans*, a produção dos glucanos insolúveis aumenta a capacidade adesiva da *C. albicans* à resina acrílica⁵. Outras espécies de *Streptococcus* também são responsáveis por aumentar a adesão de *C. albicans* nas superfícies acrílicas⁷¹.

Também foi avaliada a atividade metabólica do biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina por meio do teste do XTT. Os resultados mostraram que três aplicações de PDT foram mais eficazes para promover redução nos valores de absorvância, indicando maior redução no metabolismo celular do que uma aplicação. Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as concentrações de PDZ utilizados na PDT, a maior redução de metabolismo celular foi de 56% quando foram realizadas três aplicações de PDT mediada por 200mg/L de PDZ e dose de luz de 37,5J/cm². Para uma aplicação de PDT (200mg/L associado a 37,5J/cm²) a maior redução observada foi de 41%. Na primeira parte deste estudo observamos que para o biofilme formado em fundo de placa de 96 orifícios que o valor médio de redução do metabolismo celular observado pela absorvância do XTT foi de 36,4% para uma aplicação de PDT mediada por PDZ. Desta forma, podemos sugerir que a utilização de aplicações sucessivas da PDT pode aumentar a eficácia do tratamento. Entretanto, apesar de verificarmos redução de 56% da atividade metabólica por meio do ensaio de XTT, não tivemos redução proporcional no ensaio do UFC, isto se deve as particularidades de cada ensaio. Pelos dados obtidos podemos constatar que embora a PDT tenha causado perturbação no metabolismo celular, as células ainda continuaram em condições de se recuperar e formar colônias. A diferença entre a análise desses dois testes aplicados, foram semelhantes aos resultados obtidos no estudo realizado por Khot et al.³¹ (2008) que compararam o ensaio do XTT e a quantificação de colônias (UFC/mL) no tratamento com o antifúngico Anfotericina B. Os resultados mostraram que quando foi realizado tratamento com o antifúngico houve uma diferença na estimativa de células viáveis na contagem de colônias quando comparado ao ensaio do XTT. Os autores sugeriram que a diferença nas estimativas de células viáveis

com base em ensaios de contagem de colônias versus XTT originou-se de uma alteração do ritmo de crescimento de células danificadas pela exposição à Anfotericina B, mas que ainda apresentavam a habilidade de produzir colônias. Foi observado que as células expostas ao tratamento formaram colônias com variados tamanhos, enquanto que os micro-organismos do grupo controle formaram colônias com tamanhos relativamente uniformes. Nas avaliações do estado metabólico, as células com crescimento mais lento e/ou taxas metabólicas menores contribuem proporcionalmente menos com a estimativa global de viabilidade. Por outro lado, as células que produzem colônias contribuem igualmente para a estimativa da viabilidade baseados em UFC/mL, independentemente do tamanho da colônia. Assim, os resultados obtidos nos testes não podem ser comparados de forma direta, entretanto, a utilização do teste de XTT complementa os resultados obtidos no ensaio de contagem de colônias apontando os efeitos do tratamento sobre a atividade metabólica dos micro-organismos além da capacidade formar colônias observadas no ensaio de UFC/mL.

Para complementar a análise do biofilme, a análise dos valores de absorbância do CV, obtidos pelo ensaio de biomassa total, mostrou que três aplicações de PDT foram mais efetivas na redução do biofilme, formado sobre corpos-de-prova de resina, do que uma aplicação para as duas concentrações utilizadas. A maior redução obtida na biomassa total foi de 14,59% para três aplicações de PDT quando mediada por 200mg/L de PDZ. Foi observado também que para o ensaio de biomassa total tanto para a primeira parte do estudo, no qual o biofilme foi formado em fundo de placa de 96 orifícios, quanto para a segunda parte do estudo, no qual o biofilme foi formado sobre copros-de-prova de resina acrílica, uma aplicação de PDT não promoveu redução significativa nos valores de absorbância do CV. Referente aos dados obtidos no presente estudo é importante ressaltar que a PDT foi mais eficaz na redução da viabilidade, quando foram realizadas três aplicações sucessivas, independentemente da concentração de PDZ utilizada e do ensaio aplicado para verificar a eficácia do tratamento. Esse fato pode estar relacionado à predominância da fotossensibilização letal nas camadas mais externas do biofilme^{47,51,77}. Alguns estudos têm mostrado que a aplicação da PDT em biofilmes é capaz de promover inativação microbiana, parcial ou total, além de remover as camadas celulares mais externas dos biofilmes^{13,25,51}. Este efeito sobre o biofilme pode gerar uma desorganização do biofilme e deixá-lo mais susceptível a

outras aplicações de PDT. A utilização de aplicações sucessivas da fototerapia é interessante porque, diferentemente dos tratamentos convencionais, ela envolve alvos biomoleculares não específicos e sua ação é por produção de espécies reativas de oxigênio, desta forma, é menos provável que os micro-organismos desenvolvam resistência a este tratamento³³. Contudo, são escassos na literatura estudos que relatam múltiplas aplicações de PDT. O estudo realizado por Lulic et al.³⁷ (2009) avaliou os benefícios das repetidas aplicações da PDT mediada por cloreto de fenotiazina associada ao laser como adjuvante do tratamento periodontal convencional de pacientes com presença de bolsas residuais. Os pacientes foram divididos em grupo controle, para os quais foram realizados apenas o tratamento periodontal convencional, e o grupo experimental, no qual após o tratamento convencional, foram realizadas cinco aplicações de PDT no período de duas semanas. Nos períodos de 1, 3, 6 e 12 meses após a realização dos tratamentos, foram avaliadas a profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento a sondagem, e os valores obtidos foram comparados aos valores iniciais anteriormente às intervenções. Os resultados mostraram que as repetidas aplicações da PDT adjuvante ao tratamento convencional proporcionaram melhores resultados clínicos para as bolsas residuais para os critérios avaliados, sendo recomendada para o tratamento de pacientes em manutenção. Para o tratamento de pacientes com diagnóstico de estomatite protética, Mima et al.⁴³ (2012) compararam a eficácia da PDT mediada pelo Photogem associado a luz LED ao tratamento convencional com o antifúngico Nistatina. Para o grupo Nistatina, os pacientes foram submetidos ao tratamento antifúngico tópico com suspensão oral de Nistatina (100 000 UI). Cada paciente recebeu a medicação e foi instruído a utilizá-la quatro vezes por dia, durante 15 dias. Para o grupo PDT foram realizadas seis sessões de aplicação de PDT em um intervalo de quinze dias. Os resultados mostraram que os grupos PDT e Nistatina apresentaram sucesso clínico de 45% e 53%, respectivamente, sem diferença significativa entre os tratamentos. Desta forma, os dados em nosso estudo comprovam que aplicações sucessivas da PDT favorecem a desarticulação do biofilme, e assim os micro-organismos ficam mais expostos ao agente antimicrobiano e a PDT pode ser mais eficaz.

Além disso, para ilustrar o efeito da PDT no biofilme formado sobre os corpos-de-prova de resina foi realizada a análise microscópica por MCVL. As imagens mostraram poucas células fúngicas fluorescentes em vermelho, mas um

aumento expressivo de células bacterianas marcadas com fluorescência vermelha quando foram realizadas três aplicações de PDT mediada por PDZ na concentração de 200mg/L, comparados ao controle (P-L- (III)). Estas imagens reforçam a maior efetividade da PDT sobre células bacterianas. Com base nesta segunda etapa deste estudo, os resultados obtidos demonstraram que três aplicações de PDT mediada por PDZ associado à luz LED vermelha, foi eficaz na redução da viabilidade das células do biofilme multi-espécies avaliado.

Além do PDZ, outros fotossensibilizadores têm sido efetivos para a fotoinativação de micro-organismos. Dentre eles, a Cur, entretanto, a literatura é escassa de informações sobre a utilização da Cur na fotoinativação de micro-organismos, bem como a sua eficácia em biofilmes multi-espécies com diferentes tempos de desenvolvimento. Assim, na terceira etapa do estudo foi avaliado o efeito fotodinâmico de diferentes concentrações do FS Cur (80, 100 e 120 μ M) associadas à luz LED (37,5J/cm²) sobre biofilmes multi-espécies, cultivados pelos períodos de 24 ou 48h sobre amostras de resina acrílica. Desta forma, foi observado que para o biofilme multi-espécies de 24 horas todos os micro-organismos foram sensíveis a PDT mediada pelas três concentrações de Cur utilizadas (80, 100 e 120 μ M). Embora não tenha sido verificada diferença estatística entre as concentrações utilizadas, as maiores reduções logarítmicas foram obtidas quando a Cur foi aplicada na concentração de 120 μ M associada à luz LED, resultando em redução de 1,01log₁₀ para *C. albicans*, 1,27 log₁₀ para *C. glabrata* e 1,8 log₁₀ para *S. mutans* quando comparado ao grupo controle (P-L-(24h)). Adicionalmente, no biofilme de 24 horas a aplicação da concentração de 120 μ M na ausência de exposição à luz (P120+L-(24h)) resultou em uma discreta redução da viabilidade celular.

Para o biofilme de 48 horas, foi observada redução da viabilidade de *C. albicans* de 0,82 log₁₀ apenas quando foi aplicada a maior concentração de Cur (120 μ M) associada à luz LED. Para os micro-organismos *C. glabrata* e *S. mutans* as três concentrações de Cur associadas à luz LED foram efetivas para a redução da viabilidade celular, não apresentaram diferença estatística entre si, entretanto as maiores reduções logarítmicas foram de 0,99 log₁₀ e 1,20log₁₀ para *C. glabrata* e *S. mutans*, respectivamente, quando aplicada a concentração de 120 μ M associada à luz LED. Além disso, para o biofilme de 48 horas, a presença Cur na ausência de luz LED (P80+L- (48h), P100+L-(48h) e P120+L- (48h)), não resultou na redução de nenhum dos micro-organismos avaliados.

Os micro-organismos quando associados na forma de biofilmes apresentam organização diferenciada, assim o comportamento e a suscetibilidade dos micro-organismos podem ser alterados durante o processo de desenvolvimento do biofilme³⁶, interferindo no sucesso dos tratamentos. Portanto, o desenvolvimento de biofilmes deve ser considerado como um fator importante que pode resultar em maior dificuldade no tratamento das infecções. Chandra et al.⁹ (2001) mostraram que o biofilme de *C. albicans* progride em três fases distintas de desenvolvimento em modelo de polimetilmetacrilato: fase inicial (0 a 11 h), fase intermediária (12 a 30 h), e fase de maturação (38 a 72 h). Nas primeiras horas da fase inicial, foi observado que a maioria das células de *C. albicans* estavam na forma de blastósporos aderidos à superfície das tiras de polimetilmetacrilato. Próximo às 11 horas, as colônias de *C. albicans* apareceram como faixas espessas de crescimento fúngico, devido ao crescimento da célula e a agregação ao longo das áreas de irregularidades de superfície. A fase de desenvolvimento intermediária foi caracterizada pelo aparecimento de material predominantemente extracelular, semelhante a uma película turva cobrindo as colônias fúngicas. Durante a fase de maturação, a quantidade de material extracelular aumentou com o tempo de incubação, e as células de *C. albicans* ficaram completamente envolvidas dentro deste material, constituindo o biofilme. Além disso, a organização em multicamadas observadas em biofilmes garante vantagens como a proteção contra agentes antimicrobianos e dificulta a penetração do FS nas camadas mais profundas⁵³, tornando os micro-organismos organizados em biofilmes menos suscetíveis à ação da PDT. Os resultados obtidos no estudo nos permite sugerir que o biofilme de 24 horas por apresentar menor quantidade de matriz extracelular, pode ter propiciado maior penetração da Cur, assim, a concentração de 80µM de Cur foi eficiente para a redução dos micro-organismos, tanto quanto as concentrações mais elevadas (100 e 120 µM).

Adicionalmente, foi verificado que a maior concentração de Cur (120µM) na ausência de luz LED (P120+L- (24h)) promoveu redução da viabilidade celular causando discreta redução os micro-organismos no biofilme de 24 horas. Este resultado está de acordo com os estudos que têm sugerido que a Cur por si só pode apresentar efeito antimicrobiano^{23,40,55,61}. Estudo realizado por Garcia-Gomes et al.²³ (2011) confirmou o efeito antifúngico da Cur ao verificar que a concentração de 50 µM de Cur, na ausência de exposição a luz, foi capaz de inibir o crescimento de *C.*

albicans. Assim, a associação de Cur com a luz tem sido proposta para potencializar sua ação antifúngica¹⁹. No biofilme de 48 horas, apesar de ter sido observado menores valores de redução logarítmica quando comparado ao biofilme de 24h, os micro-organismos *C. glabrata* e *S. mutans* apresentaram redução da viabilidade celular para as três concentrações de Cur quando associadas à luz LED. No entanto, para *C. albicans*, a redução dos valores de \log_{10} foi obtida apenas para a maior concentração utilizada. De acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal obtidas por Seneviratne et al.⁶⁰ (2009) *C. albicans* forma biofilmes mais espessos que apresentam características tridimensional e múltiplas camadas do biofilme, quando comparado a *C. glabrata* que produz biofilmes finos e compactos. Portanto, a arquitetura mais robusta do biofilme formado por *C. albicans* pode ter sido um fator relevante que dificultou a penetração do Fs Cur no biofilme. Além disso, para o biofilme de 48 horas, nenhuma das concentrações de Cur na ausência de luz (P80+L- (48h), P100+L- (48h) e P120+L- (48h) foi capaz de provocar efeito na redução da viabilidade celular para os micro-organismos avaliados. Assim, podemos sugerir que, para o biofilme de 48 horas, a ação da PDT foi dificultada sobre os micro-organismos. Provavelmente por isso, a concentração de Cur a 120 μ M na ausência de luz não exibiu características antimicrobianas quando comparado ao biofilme de 24 horas.

Além disso, as diferentes concentrações de Cur não promoveram diferença estatística quanto à efetividade da PDT. O estudo realizado por Dovigo et al.¹⁹ (2011) avaliou a fotodegradação da Cur na concentração de 20 μ M e foi demonstrado que doses de luz maiores que 5,28 J/cm² não promoveram aumento da efetividade da PDT para esta concentração avaliada. Isto ocorreu porque a partir de 4 minutos (tempo referente à dose de 5,28 J/cm²) ocorreu um aumento da fotodegradação de Cur (20 μ M), e redução da produção de espécies reativas de oxigênio, estabilizando o efeito fototóxico da Cur. Em contraste, no presente estudo em decorrência da utilização de concentrações mais elevadas de Cur (80, 100 e 120 μ M) para a PDT, do que as utilizadas no estudo de Dovigo et al.¹⁹ (2011) provavelmente a dose de luz de 37,5J/cm² não foi suficiente para ativar completamente todas as moléculas do FS presentes na solução, e assim pode não ter ocorrido uma completa fotodegradação do FS. A possibilidade de não ter ocorrido à completa fotodegradação deve-se ao fato de que durante a fase experimental não foi observada após a iluminação com o LED o completo fotobranqueamento das

soluções de Cur. Assim, a produção limitada de espécies reativas de oxigênio pode ter atingido um patamar de fototoxicidade, desta forma, mesmo as concentrações mais altas não foram mais eficazes para a redução da viabilidade celular quando comparadas à menor concentração. Isto justifica a ausência de diferença na redução microbiana quando foram submetidos a PDT mediada pelas três concentrações de Cur. Levando em consideração as limitações deste estudo, não foram utilizadas maiores doses de luz para avaliar o efeito sobre o biofilme em decorrência do aparelho LED disponível para o estudo, o qual apresenta potência de 22 mW e assim, para a obtenção da dose de luz de $37,5\text{J}/\text{cm}^2$, são necessários 29 minutos de iluminação. Assim, são necessários outros estudos que avaliem diferentes doses de luz para a iluminação de concentrações altas de Cur utilizando aparelhos mais potentes para diminuir o tempo de iluminação.

Neste estudo também foi verificado a eficácia da PDT mediada pela Cur sobre metabolismo microbiano por meio do ensaio do XTT. Os resultados deste ensaio mostraram que o biofilme formado por 24 horas foi mais susceptível a PDT quando comparado ao biofilme de 48 horas, confirmando os resultados obtidos no ensaio de quantificação de colônias. Para o biofilme de 24 horas as três concentrações de Cur foram capaz de promover a redução do metabolismo celular. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre as três concentrações, a maior redução foi de 40,62% para o grupo PDT mediado pela concentração de $120\mu\text{M}$ de Cur. Porém, a presença de Cur a $120\mu\text{M}$ na ausência de luz foi responsável por causar redução de 9,40% do metabolismo celular. Para o biofilme de 48 horas, as três concentrações de Cur também reduziram o metabolismo celular, e não houve diferença estatística entre elas. Contudo, a maior redução obtida foi de 36,58% para o grupo PDT mediado pela Cur a $120\mu\text{M}$. Além disso, para o biofilme de 48 horas, a presença de Cur na ausência de luz não promoveu redução do metabolismo celular.

Para complementar o estudo, foi realizado o teste de biomassa total por meio da coloração do cristal violeta. Os resultados apresentados para este ensaio demonstraram que a PDT, mediada pelas três concentrações de Cur, foi eficiente na redução da biomassa total. No biofilme de 24 horas a maior redução foi de 13% da biomassa total quando a PDT foi mediada por Cur a $120\mu\text{M}$, embora não tenha sido demonstrada diferença significativa entre as concentrações utilizadas. Para o biofilme de 48 horas a maior redução obtida foi de 5,63% para a PDT mediada por

Cur a 120 μM . Semelhantemente ao biofilme de 24 horas, não foi observada diferença significativa entre os grupos PDT (P80+L+, P100+L+, P120+L+). De acordo com estes resultados, a PDT foi capaz não apenas de reduzir a viabilidade celular e o metabolismo celular, como também foi eficiente para reduzir a biomassa total dos biofilmes formados sobre os corpos-de-prova de resina acrílica. Alguns estudos têm indicado que a PDT pode atuar sobre o biofilme por meio da morte celular e da ruptura do biofilme^{13,25}. O estudo de Goulart et al.²⁵ mostrou por meio de imagens microscópica que a quantidade de células microbianas aderidas ao biofilme reduziram após a aplicação da PDT. Em concordância com essas investigações, o estudo recente realizado por Dovigo et al.¹⁸ (2011) mostram redução da biomassa dos biofilmes mono-espécie formados por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* de 52,3%, 69,1% e 64,1%, respectivamente, após a aplicação de PDT mediada por 40 μM Cur e dose de luz de 18 J/cm^2 . De acordo como os autores, o ensaio de CV mostrou que a cepa de *C. albicans* apresentou maior capacidade de produzir biofilme *in vitro* quando comparada as cepas de *C. glabrata* e *C. tropicalis* isoladas. No presente estudo observamos valores de absorvância menor para o biofilme multi-espécies quando comparado a estudos que avaliaram biofilme mono-espécie, evidenciando que a associação entre os diferentes micro-organismos avaliados é benéfica para a sobrevivência dos mesmos, entretanto, é possível que a PDT mediada por Cur tenha sido capaz de ter provocado desorganização do biofilme, reduzindo assim a biomassa total.

A análise MCVL utilizando o kit de coloração LIVE/DEAD[®] permitiu avaliar a viabilidade dos biofilmes formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica por 24 e 48 horas após o tratamento com a PDT. Neste estudo apesar de não ter sido realizada a contagem dos micro-organismos marcados com fluorescência verde ou vermelha, as imagens apresentadas mostram que após tratamento com PDT (P120+L+(24h) e P120+L+ (48h)) ocorreu aumento visual de células coradas em vermelho quando comparado aos seus respectivos controles P-L- (24h) e P-L- (48h), indicando que houve dano celular e a penetração do fluorocromo Iodeto de Propídio na célula. Além disso, visualmente o grupo P120+L+ (24h) apresentou maior número de células vermelhas quando comparado ao grupo experimental P120+L+(48h). Quanto à espessura do biofilme, o grupo controle P-L- (24h) apresentou espessura de 20 μM , enquanto que o grupo controle P-L- (48h) apresentou espessura de 23,5 μM , mostrando aumento da espessura do biofilme de

48 horas. Adicionalmente o grupo controle de FS P120+L- (24h), mostrou aumento na quantidade de células vermelhas quando comparado ao grupo controle P-L- (24h), comprovando a atividade antimicrobiana da Cur, mesmo em condições de ausência de iluminação ^{40,55,61}, uma vez que foi observada ação tóxica por meio da MCVL. Os resultados deste estudo indicam que a Cur é um agente FS promissor na PDT, capaz de reduzir os micro-organismos presentes no biofilme polimicrobiano. Contudo, outros estudos devem ser realizados com o objetivo de definir outras doses de luz que possam potencializar o efeito da PDT.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e levando em consideração as limitações deste estudo pode-se concluir que:

- 1- A aplicação da PDT mediada pelo FS PDZ nas concentrações de 175 e 200 mg/L associadas a luz LED ($37,5 \text{ J/cm}^2$) promoveu reduções no metabolismo celular do biofilme multi-espécies e quantificação de colônias dos micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. No entanto não foi verificada redução da biomassa para os biofilmes formados em fundo de placa de 96 orifícios.
- 2- Três aplicações sucessivas da PDT mediada pelo FS PDZ nas concentrações de 175 e 200 mg/L associadas a luz LED ($37,5 \text{ J/cm}^2$) apresentaram melhores resultados na redução de *S. mutans* (UFC/mL) presente no biofilme formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica. O protocolo de três aplicações também foi mais efetivo na redução do metabolismo celular e biomassa total.
- 3- A PDT mediada por Cur nas concentrações de 80, 100 e $120 \mu\text{M}$, associadas à luz LED ($37,5 \text{ J/cm}^2$) foi eficaz na redução da viabilidade celular (UFC/mL) dos micro-organismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* nos biofilmes de 24 horas formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica. Além disso, foi observado efeito significativo na redução do metabolismo celular e biomassa total.
- 4- A PDT mediada por Cur nas concentrações de 80, 100 e $120 \mu\text{M}$, associadas à luz LED ($37,5 \text{ J/cm}^2$) promoveu redução significativa dos micro-organismos *C. glabrata* e *S. mutans* nos biofilmes de 48 horas formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica. Para a *C. albicans* a redução na viabilidade celular ocorreu apenas quando a concentração de $120 \mu\text{M}$ foi associada à luz LED ($37,5 \text{ J/cm}^2$). A PDT mediada por Cur nas três concentrações também foi efetiva na redução do metabolismo celular e biomassa dos biofilmes formados por 48 horas.

- 5- As imagens de MCVL mostram aumento visual de micro-organismos mortos, ou seja, aumento de células com fluorescência vermelha após a PDT mediada por PDZ ou Cur, nas diferentes condições estudadas, quando comparadas as imagens dos respectivos grupos controle.
- 6- Para todas as condições avaliadas neste estudo a bactéria avaliada foi mais susceptível a PDT quando comparada às espécies de *Candida*.

A decorative oval shape with a light green background and a pattern of overlapping, semi-transparent geometric shapes (squares and rectangles) in a slightly darker shade of green. The word "Referencias" is written in a dark green, cursive font across the center of the oval.

Referencias

8 REFERENCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922): 455-9.
2. Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008; 5(1): 19-28.
3. Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida spp*. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(2): 200–10.
4. Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10(1): 27-39.
5. Branting C, Sund ML, Linder LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces in vitro. *Arch Oral Biol*. 1989; 34(5): 347-53.
6. Budtz-Jorgensen E, Theilade E. Regional variations in viable bacterial and yeast counts of 1-week-old denture plaque in denture-induced stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1983; 91(4): 288-95.
7. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci*. 2005; 4(7): 523-30.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.

8. 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(5): 1141-8.
9. 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(18): 5385-94.
10. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903-8.
11. Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent.* 1995; 74(3): 309-13.
12. Chu ESM, Wu RWK, Yow CMN, Wong TKS, Chen JY. The cytotoxic and genotoxic potential of 5-aminolevulinic acid on lymphocytes: a comet assay study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 58(3): 408-14.
13. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol.* 2010; 61(5): 411-6.
14. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras.* 1996; 42(4): 229-36.
15. Correa JC, Bagnato VS, Imasato H, Perussi JR. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. *Laser Physics.* 2012; 22(9): 1387-94
16. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318-22.
17. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2329-35.

18. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9): 927-34.
19. 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(4): 895-903.
20. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agente: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103(11): 1545-57.
21. Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photossensitizers. *Laser Phys Lett.* 2008; 5(2): 156-61.
22. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(1): 59-66.
23. 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.* 2012; 50(1): 26-32.
24. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
25. Goulart RC, Bolean M, Paulino TP, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): S53-60.
26. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992; 55(1): 145-57.
27. Hope CK, Wilson M. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(6): 1227-30.

28. Hoyle BD, Williams LJ, Costerton JW. Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infect Immun*. 1993; 61(2): 777-80.
29. Hsu LY, Minah GE, Peterson DE, Wingard JR, Merz WG, Altomonte V, et al. Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(12): 2621-6.
30. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006; 38(5): 468–81.
31. Khot PD, Suci PA, Tyler BJ. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: assessment using metabolic assays and colony forming units. *J Microbiol Methods*. 2008; 72(3): 268-74.
32. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985; 50(1): 97-101.
33. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 694-707.
34. Koon HK, Leung AWN, Yue KKM, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006; 25(1-2): 205-15.
35. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. The susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53(2): 383-5.
36. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 242(2): 345-51.

37. Lulic M, Leiggener Görög I, Salvi GE, Ramseier CA, Mattheos N, Lang NP. One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36(8): 661-6.
38. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(20): 189-93.
39. Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(7): 588-96.
40. Martins CVB, Silva DL, Neres ATM, Magalhães TFF, Watanabe GA, Modolo LV et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2): 337-9.
41. Millsap KW, Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1999; 75(4): 351–9.
42. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(12): 827-33.
43. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(10): E380-8.
44. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115(1): 77-80.

45. Nalbant AD, Kalkanci A, Filiz B, Kustimur S. Effectiveness of different cleaning agents against the colonization of *Candida* spp and the in vitro detection of the adherence of these yeast cells to denture acrylic surfaces. *Yonsei Med J* 2008; 49(4): 647- 54.
46. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008; 35(11): 836-46.
47. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med.* 2002; 31(2): 86-90.
48. Park JH, Moon YH, Bang IS, Kim YC, Kim SA, Ahn SG, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorine e_6 . *Laser Med Sci.* 2010; 25(5): 705-10.
49. Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans Candida* species on acrylic substrate. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(1): 70-5.
50. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2008; 72(2): 157-65.
51. 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(3): 341-8.
52. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(8): 755-64.

53. 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(3): 288-93.
54. Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol*. 2005; 62(1): 112-6.
55. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol C: Photochem Reviews*. 2009; 10(2): 81–95.
56. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18(4): 163–170.
57. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(2): 391-8.
58. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Denture disinfection by microwave irradiation: A randomized clinical study. *Journal of Dentistry*. 2009; 37(9): 666-72.
59. Ribeiro, RC. Efeito do tempo e da desinfecção por micro-ondas no desempenho clínico e na quantificação de micro-organismos de um reembasador rígido [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.
60. Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(11): 1052-60.
61. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005; 41(13): 1955-68.
62. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*. 2009; 47(7): 681-9.

63. Skillman LC, Sutherland IW, Jones MV. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J Appl Microbiol.* 1998; 85(1): 13S-18S.
64. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: Enhancement of photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med.* 2003; 33(3): 161-68.
65. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143-66.
66. Strackhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiol.* 2002; 71(3): 345-48.
67. Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res.* 2012; 46(6): 549-54.
68. Theilade E, Budtz-Jorgensen E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 3(1): 8-13.
69. Tonnesen HH, Vries H, Karlsen J, Van Henegouwen GB. Studies on Curcumin and curcuminoids IX: investigation of photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci.* 1987; 76(5): 371-3.
70. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997; 77(5): 535-9.
71. Verran J, Motteram KL. The effect of adherent *oral streptococci* on the subsequent adherence of *Candida albicans* to acrylic in vitro. *J Dent.* 1987; 15(2): 73-6.
72. Waltimo T, Valittu P, Haapasalo M. Adherence of *Candida* species to newly polymerized and water-stored denture base polymers. *Int J Prosthodont.* 2001; 14(5): 457-60.

73. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(1): 13-28.
74. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57(4): 680-4.
75. Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil.* 2005; 32(7): 518-25.
76. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, Miyake Y. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses.* 2010; 53(3): 221-6.
77. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(2): 324-30.
78. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001; 144(2): 274-8.
79. Zisis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000; 13(2): 136-40.



APÊNDICE

Cálculos realizados para a obtenção das proporções utilizadas no preparo das concentrações do Photodithazine® e da Curcumina.

Apêndice 1 - Cálculos das concentrações de PDZ e Cur

Avaliação da eficácia PDT mediada por diferentes concentrações de PDZ associada à luz LED na inativação de biofilme multi-espécies formado em fundo de placa de orifícios.

Photodithazine® – Solução estoque de PDZ 5000 mg/L.

- **100 mg/L**

Preparo da concentração de 100 mg/L de PDZ para o volume final de 1200 µL (volume para uma ocasião, aplicação de 200 µL em cada orifício):

$\begin{array}{r} 5000\text{mg/L} \text{-----} 100\% \\ 100\text{mg/L} \text{-----} x \\ X = 2\% \end{array}$	$\begin{array}{r} 1200\mu\text{L} \text{-----} 100\% \\ y \text{-----} 2\% \\ y = 24 \mu\text{L de PDZ} \end{array}$
---	--

Assim, para o preparo da solução de 100 mg/L de PDZ, foi utilizado 24 µL de PDZ e 1176 µL de solução salina.

- **150 mg/L**

Preparo da concentração de 150 mg/L de PDZ para o volume final de 1200 µL (volume para uma ocasião, aplicação de 200 µL em cada orifício):

$\begin{array}{r} 5000\text{mg/L} \text{-----} 100\% \\ 150\text{mg/L} \text{-----} x \\ X = 3\% \end{array}$	$\begin{array}{r} 1200\mu\text{L} \text{-----} 100\% \\ y \text{-----} 3\% \\ y = 36 \mu\text{L de PDZ} \end{array}$
---	--

Assim, para o preparo da solução de 150 mg/L de PDZ, foi utilizado 36 μ L de PDZ e 1164 μ L de solução salina.

- **175 mg/L**

Preparo da concentração de 175 mg/L de PDZ para o volume final de 1200 μ L (volume para uma ocasião, aplicação de 200 μ L em cada orifício):

$\begin{array}{l} 5000\text{mg/L} \text{-----} 100\% \\ 175\text{mg/L} \text{-----} x \\ X = 3,5\% \end{array}$	$\begin{array}{l} 1200\mu\text{L} \text{-----} 100\% \\ y \text{-----} 3,5\% \\ y = 42 \mu\text{L de PDZ} \end{array}$
---	--

Assim, para o preparo da solução de 175 mg/L de PDZ, foi utilizado 42 μ L de PDZ e 1158 μ L de solução salina.

- **200 mg/L**

Preparo da concentração de 200 mg/L de PDZ para o volume final de 1200 μ L (volume para uma ocasião, aplicação de 200 μ L em cada orifício):

$\begin{array}{l} 5000\text{mg/L} \text{-----} 100\% \\ 200\text{mg/L} \text{-----} x \\ X = 4\% \end{array}$	$\begin{array}{l} 1200\mu\text{L} \text{-----} 100\% \\ y \text{-----} 4\% \\ y = 48 \mu\text{L de PDZ} \end{array}$
---	--

Assim, para o preparo da solução de 200 mg/L de PDZ, foi utilizado 48 μ L de PDZ e 1152 μ L de solução salina.

- **250 mg/L**

Preparo da concentração de 250 mg/L de PDZ para o volume final de 1200 µL (volume para uma ocasião, aplicação de 200 µL em cada orifício):

5000mg/L----- 100%	1200µL -----100%
250mg/ L ----- x	y ----- 5%
X = 5%	y = 60 µL de PDZ

Assim, para o preparo da solução de 250 mg/L de PDZ, foi utilizado 60µL de PDZ e 1140 µL de solução salina.

Avaliação da eficácia de aplicações sucessivas da PDT mediada pelo PDZ associada à luz LED na inativação de biofilme multi-espécies formado sobre corpos-de-prova de resina acrílica.

Photodithazine® – Solução estoque de PDZ 5000 mg/L.

- **175 mg/L**

Preparo da concentração de 175 mg/L de PDZ para o volume final de 12.000 µL (volume para uma ocasião, aplicação de 2.000µL em cada orifício). Para situação em que foi realizada apenas uma aplicação de PDT:

5000mg/L----- 100%	12000µL -----100%
175mg/ L ----- x	y ----- 3,5%
X = 3,5%	y = 420 µL de PDZ

Assim, para o preparo da solução de 175 mg/L de PDZ, foi utilizado 420 µL de PDZ e 11580 µL de solução salina.

- **200 mg/L**

Preparo da concentração de 200 mg/L de PDZ para o volume final de 12.000 μ L (volume para uma ocasião, aplicação de 2.000 μ L em cada orifício). Para situação em que foi realizada apenas uma aplicação de PDT:

$$\begin{array}{rcl}
 5000\text{mg/L} & \text{-----} & 100\% \\
 200\text{mg/L} & \text{-----} & x \\
 X & = & 4\%
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{rcl}
 12000\mu\text{L} & \text{-----} & 100\% \\
 y & \text{-----} & 4\% \\
 y & = & 480 \mu\text{L de PDZ}
 \end{array}$$

Assim, para o preparo da solução de 200 mg/L de PDZ, foi utilizado 480 μ L de PDZ e 11520 μ L de solução salina.

Avaliação da eficácia de diferentes concentrações do FS Cur (80, 100 e 120 μ M) associada e luz LED (455nm) sobre biofilmes multi-espécies cultivados por diferentes períodos (24 e 48h) sobre amostras de resina acrílica.

- ◆ **Cur – Solução mãe 0,016M**

Preparo da solução estoque:

Para o preparo de uma solução estoque de 800 μ M, 100 μ L de Cur a 0,016M foram solubilizadas com 1900 μ L de DMSO. A partir dessa solução estoque foram obtidas as concentrações desse estudo.

As soluções de Cur foram obtidas mantendo o diluente DMSO a 10%.

- **80 μM**

Preparo da concentração de 80 μM de Cur para o volume final de 12.000 μL (uma ocasião, aplicação de 2.000 μL em cada orifício):

$$\begin{aligned} C_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}} &= C_{\text{final}} \cdot V_{\text{final}} \\ 800 \mu\text{M} \cdot V_{\text{inicial}} &= 80 \mu\text{M} \cdot 12000 \mu\text{L} \\ V_{\text{inicial}} &= 1200 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Dessa forma, para o preparo da concentração de 80 μM de Cur foi utilizado 1200 μL de Cur e 10800 μL de solução salina.

- **100 μM**

Preparo da concentração de 100 μM de Cur para o volume final de 12.000 μL (uma ocasião, aplicação de 2.000 μL em cada orifício):

$$\begin{aligned} C_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}} &= C_{\text{final}} \cdot V_{\text{final}} \\ 800 \mu\text{M} \cdot V_{\text{inicial}} &= 100 \mu\text{M} \cdot 12000 \mu\text{L} \\ V_{\text{inicial}} &= 1500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Dessa forma, para o preparo da concentração de 100 μM de Cur foi utilizado 1500 μL de Cur e 10500 μL de solução salina.

- **120 μM**

Preparo da concentração de 80 μM de Cur para o volume final de 12.000 μL (uma ocasião, aplicação de 2.000 μL em cada orifício):

$$\begin{aligned} C_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}} &= C_{\text{final}} \cdot V_{\text{final}} \\ 800 \mu\text{M} \cdot V_{\text{inicial}} &= 120 \mu\text{M} \cdot 12000 \mu\text{L} \\ V_{\text{inicial}} &= 1800 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Dessa forma, para o preparo da concentração de 120 μM de Cur foi utilizado 1800 μL de Cur e 10200 μL de solução salina.

Apêndice 2: Cálculos dos tempos de iluminação com luz LED

◆ Cálculo do tempo de iluminação, para aparelho Dual Table (LED vermelho)

$$\text{Dose de luz} = 37,5 \text{ J/cm}^2$$

$$\text{Potência do aparelho} = 71,7 \text{ mW} = 0,0717 \text{ W}$$

$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = \text{Potência (W/cm}^2\text{)} \times \text{Tempo de iluminação (seg)}$$

$$37,5 \text{ J/cm}^2 = 0,0717 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 523 \text{ s} = 9 \text{ min}$$

◆ Cálculo do tempo de iluminação, para o aparelho Bio Table (LED azul)

$$\text{Dose de luz} = 37,5 \text{ J/cm}^2$$

$$\text{Potência do aparelho} = 22 \text{ mW} = 0,022 \text{ W}$$

$$\text{Dose de luz (J/cm}^2\text{)} = \text{Potência (W/cm}^2\text{)} \times \text{Tempo de iluminação (seg)}$$

$$37,5 \text{ J/cm}^2 = 0,022 \text{ W/cm}^2 \times T$$

$$T = 1704,5 \text{ s} = 29 \text{ min}$$

Apêndice 3: Tabelas de dados obtidos no estudo

As tabelas de 1 a 5 se referem aos resultados obtidos para o FS PDZ quando foram realizados os ensaios de quantificação de colônias (UFC/mL), XTT e biomassa total, para os biofilmes multi-espécies formados em fundo de placa de 96 orifícios.

Tabela 1- Valores da quantificação de colônias de *C. albicans*, transformados em logaritmo na base 10, obtidos após os biofilmes multi-espécies serem submetidos a diferentes concentrações de PDZ (0, 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P100+L-	P100+L+	P150+L-	P150+L+	P175+L-	P175+L+	P200+L-	P200+L+	P250+L-	P250+L+
	6.24	6.93	6.69	6.81	6.56	6.53	6.29	6.23	6.93	5.98	5.78	6.93
	6.47	6.78	6.71	6.90	6.65	6.60	6.50	6.48	6.88	5.85	5.74	6.88
	6.20	6.95	6.81	6.93	6.44	6.39	6.47	6.13	6.78	5.93	5.88	6.95
	6.58	6.27	6.73	6.98	6.38	6.41	6.33	6.61	6.26	5.90	5.28	6.55
	6.40	6.41	6.77	6.88	6.74	6.30	6.37	6.54	6.22	5.98	5.24	6.18
	6.54	6.22	6.66	6.98	6.29	6.50	6.36	6.41	6.04	5.85	5.30	6.31
	6.93	6.90	6.85	6.30	6.84	6.95	6.42	6.78	6.30	5.95	5.02	6.55
	6.98	6.85	6.70	6.98	6.65	6.98	6.49	6.74	6.93	5.95	5.00	6.53
	6.81	6.81	6.84	6.60	6.94	6.65	6.64	6.70	6.85	5.93	5.04	6.71

Tabela 2- Valores da quantificação de colônias de *C. glabrata*, transformados em logaritmo na base 10, obtidos após os biofilmes multi-espécies serem submetidos a diferentes concentrações de PDZ (0, 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P100+L-	P150+L-	P175+L-	P200+L-	P250+L-	P100+L+	P150+L+	P175+L+	P200+L+	P250+L+
6.44	6.98	6.86	6.54	6.45	6.59	6.29	6.48	6.93	5.81	5.95	6.42	
6.56	6.81	6.90	6.04	6.64	6.48	6.50	6.48	6.98	5.98	5.74	6.02	
6.23	6.95	6.68	6.33	6.72	6.33	6.47	6.30	6.90	5.90	5.98	6.34	
6.82	6.56	6.85	6.93	6.94	6.55	6.59	6.83	6.89	5.74	5.60	6.52	
6.76	6.43	6.80	6.98	6.98	6.85	6.53	6.97	6.87	5.90	5.84	6.66	
6.95	6.64	6.75	6.81	6.79	6.63	6.65	6.83	6.70	5.85	5.74	6.81	
6.98	6.98	6.79	6.85	6.99	6.98	6.54	6.69	6.60	5.88	5.02	6.00	
6.98	6.98	6.66	6.95	6.93	6.93	6.64	6.72	6.60	5.74	5.02	6.65	
6.93	6.95	6.84	6.78	6.91	6.98	6.41	6.77	6.98	5.93	5.06	6.73	

Tabela 3- Valores da quantificação de colônias de *S. mutans*, transformados em logaritmo na base 10, obtidos após os biofilmes multi-espécies serem submetidos a diferentes concentrações de PDZ (0, 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

P-L-	P-L+	P100+L-	P150+L-	P175+L-	P200+L-	P250+L-	P100+L+	P150+L+	P175+L+	P200+L+	P250+L+
7.82	7.82	7.26	7.70	7.67	7.42	7.93	7.70	7.55	5.53	5.02	7.86
7.64	7.64	7.51	7.69	7.52	7.59	7.87	7.77	7.61	5.61	5.48	7.68
7.76	7.76	7.24	7.75	7.59	7.36	7.81	7.71	7.56	5.54	5.32	7.93
7.47	7.47	7.56	7.96	7.48	7.79	7.41	7.96	7.62	5.81	4.88	7.41
7.16	7.16	7.69	7.61	7.19	7.95	7.64	7.60	7.13	5.78	4.95	7.48
7.08	7.08	7.69	7.49	7.37	7.83	7.87	7.80	7.18	5.93	4.40	7.66
7.88	7.88	7.41	7.92	7.53	7.87	7.92	7.82	7.19	5.93	5.70	7.39
7.71	7.71	7.47	7.92	7.67	7.91	7.87	7.78	7.43	5.65	5.54	7.39
7.71	7.71	7.64	7.59	7.96	7.94	7.82	7.84	7.38	5.93	5.40	7.15

Tabela 4- Valores originais obtidos pelo ensaio do XTT, após os biofilmes multi-espécies serem submetidos a diferentes concentrações de PDZ (0, 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

P-L-	P-L+	P100+L-	P150+L-	P175+L-	P200+L-	P250+L-	P100+L+	P150+L+	P175+L+	P200+L+	P250+L+
2.635	2.459	2.353	2.538	2.432	2.266	2.370	1.773	1.930	1.806	1.990	1.965
2.684	2.511	2.330	2.639	2.275	2.486	2.550	1.622	1.648	2.107	1.954	1.944
2.724	2.516	2.610	2.596	2.719	2.475	2.726	1.382	2.002	2.260	2.013	1.989
2.862	2.574	2.556	2.526	2.523	2.567	2.419	1.902	1.651	1.665	2.028	2.231
2.750	2.630	2.541	2.617	2.512	2.386	2.419	1.731	1.523	1.685	2.103	2.243
2.862	2.574	2.568	2.589	2.561	2.554	2.367	1.773	1.808	1.703	1.903	2.237
2.736	2.621	2.583	2.482	2.443	2.224	2.367	1.804	1.872	1.709	2.034	2.294
2.695	2.583	2.630	2.601	2.462	2.386	2.600	1.782	1.702	1.621	2.025	1.987
2.683	2.627	2.610	2.688	2.599	2.597	2.601	1.900	1.826	1.626	2.013	1.989

Tabela 5- Valores originais obtidos pelo ensaio de biomassa total (coloração CV), após os biofilmes multi-espécies serem submetidos a diferentes concentrações de PDZ (0, 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

P-L-	P-L+	P100+L-	P150+L-	P175+L-	P200+L-	P250+L-	P100+L+	P150+L+	P175+L+	P200+L+	P250+L+
3.001	3.001	2.916	2.916	2.951	2.854	2.700	2.954	2.979	2.951	2.972	2.761
2.973	3.016	2.941	2.953	2.951	2.864	2.700	2.904	2.979	2.951	2.909	2.700
3.001	2.797	2.916	2.803	2.964	2.833	2.708	2.954	3.007	2.951	2.875	2.738
2.877	2.842	2.991	2.932	2.974	2.772	2.921	2.941	2.883	2.911	2.703	2.873
2.854	2.842	3.006	2.932	2.946	2.772	2.935	2.913	2.870	2.814	2.694	2.802
2.902	2.866	2.976	2.932	2.974	2.800	2.935	2.862	2.883	2.860	2.679	2.886
3.120	2.898	3.114	3.009	2.895	2.988	2.754	2.907	2.927	2.910	2.908	2.735
2.960	2.870	3.027	2.991	2.895	2.923	2.754	2.768	2.912	2.895	2.923	2.716
3.145	2.913	3.139	2.991	2.895	3.155	2.735	2.907	2.942	2.867	2.880	2.707

As tabelas de 6 a 10 se referem aos resultados obtidos para uma e três aplicações da PDT mediada pelo FS PDZ, após a realização dos ensaios de quantificação de colônias (UFC/mL), XTT e biomassa total, para os biofilmes multi-espécies formados sobre amostras de resina acrílica para base de prótese.

Tabela 6- Valores da quantificação de colônias de *C. albicans*, transformados em logaritmo na base 10 (Log_{10}), obtidos após os biofilmes multi-espécies serem submetidos à uma e três aplicações da PDT. Os biofilme foram expostos a diferentes concentrações de PDZ (0, 175, 200 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P175+L-	P200+L-	P175+L+	P200+L+
1 Aplicação de PDT	6.086	6.459	6.635	6.350	5.146	5.100
	6.188	6.176	6.474	6.260	6.301	6.270
	6.405	6.573	6.250	6.391	5.734	6.283
	6.246	6.188	6.554	6.107	5.199	5.182
	6.093	6.405	6.301	6.255	5.551	5.182
	6.134	6.134	6.230	6.176	6.114	6.462
	6.093	6.387	6.265	6.465	6.711	6.561
	6.100	6.526	6.127	6.176	6.806	5.606
	6.250	6.158	6.342	6.387	6.334	6.093
3 Aplicações de PDT	6.152	6.127	6.346	5.310	5.663	5.225
	6.121	6.158	5.845	6.225	5.653	6.326
	6.064	6.176	6.086	6.204	5.655	5.288
	6.127	6.193	6.283	6.250	5.778	6.236
	6.158	6.199	6.107	6.170	5.874	6.283
	6.127	6.241	6.270	6.246	5.801	5.107
	6.114	6.310	6.412	6.086	6.107	5.152
	6.146	6.152	6.292	6.158	5.782	5.086
	6.100	6.086	6.140	6.236	5.250	5.246

Tabela 7- Valores da quantificação de colônias de *C. glabrata*, transformados em logaritmo na base 10 (Log10), obtidos após os biofilmes multi-espécies serem submetidos à uma e três aplicações da PDT. Os biofilme foram expostos a diferentes concentrações de PDZ (0, 175, 200 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P175+L-	P200+L-	P175+L+	P200+L+
1 Aplicação de PDT	6.415	6.665	6.322	6.107	6.369	6.152
	6.477	6.152	6.629	6.330	5.318	6.220
	6.542	6.422	6.425	6.134	5.519	5.318
	6.193	6.230	6.471	6.000	6.215	5.384
	6.270	6.422	6.422	6.140	5.763	6.260
	6.373	6.334	6.342	6.176	6.134	6.220
	6.236	6.539	6.204	6.114	6.146	5.549
	6.255	6.310	6.587	6.215	5.756	6.326
	6.279	6.250	6.394	6.158	6.810	5.477
3 Aplicações de PDT	6.100	6.425	6.508	7.297	5.623	6.683
	6.093	6.480	6.220	6.615	4.699	5.602
	6.645	6.447	6.519	6.526	5.292	5.716
	6.398	6.724	6.726	6.639	6.225	6.279
	7.391	6.582	6.086	6.134	5.933	5.322
	6.408	7.127	7.699	6.480	6.279	5.537
	6.250	6.554	6.215	6.547	6.246	5.441
	7.265	6.563	6.121	6.354	6.338	5.480
	6.100	6.502	6.362	6.310	6.708	5.270

Tabela 8- Valores da quantificação de colônias de *S. mutans*, transformados em logaritmo na base 10 (Log10), obtidos após os biofilmes multi-espécies serem submetidos à uma e três aplicações da PDT. Os biofilme foram expostos a diferentes concentrações de PDZ (0, 175, 200 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P175+L-	P200+L-	P175+L+	P200+L+
1 Aplicação de PDT	7.017	7.250	7.182	7.334	5.127	6.465
	7.164	7.310	7.250	7.270	6.146	5.188
	7.164	7.577	7.236	7.176	6.152	6.338
	7.547	7.690	7.297	7.283	6.093	5.158
	7.602	7.902	7.418	7.531	6.310	6.246
	7.225	7.260	7.283	7.288	6.338	5.146
	7.491	7.188	7.225	7.250	5.164	5.394
	7.358	7.486	7.554	7.412	6.158	6.462
	7.561	7.246	7.609	7.107	5.580	6.551
3 Aplicações de PDT	7.566	7.330	7.255	7.079	5.025	3.466
	7.100	7.563	7.134	7.127	4.857	3.134
	7.645	6.825	6.358	6.100	4.699	3.644
	7.265	7.763	7.086	7.230	2.303	3.256
	7.127	7.114	6.152	6.362	4.000	3.857
	7.678	6.993	7.598	6.086	3.256	2.904
	6.968	7.188	7.310	6.164	3.204	4.152
	6.980	7.297	7.450	6.279	2.603	3.377
	7.134	7.365	7.279	6.405	3.532	3.241

Tabela 9- Valores originais obtidos pelo ensaio redução do sal de XTT, após os biofilmes multi-espécies serem submetidos à uma e três aplicações da PDT. Os biofilme foram expostos a diferentes concentrações de PDZ (0, 175, 200 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P175+L-	P200+L-	P175+L+	P200+L+
1 Aplicação de PDT	2.330	2.390	2.206	2.446	1.955	1.806
	2.510	2.368	2.507	2.363	1.991	1.887
	2.451	2.431	2.519	2.372	1.844	1.979
	2.384	2.415	2.363	2.413	1.475	1.872
	2.398	2.503	2.393	2.116	2.011	1.799
	2.404	2.403	2.660	2.504	1.932	1.897
	2.502	2.399	2.489	2.479	2.086	1.862
	2.393	2.425	2.321	2.513	1.882	1.798
	2.498	2.413	2.326	2.393	1.782	1.893
3 Aplicações de PDT	2.109	2.173	1.996	2.367	1.307	1.147
	2.038	2.179	2.097	1.961	1.546	1.343
	2.128	2.138	2.160	1.768	1.478	1.263
	2.197	2.107	2.157	2.268	1.948	1.443
	1.922	2.133	2.190	1.958	1.207	1.562
	2.236	2.123	2.117	2.001	1.412	1.574
	2.172	2.133	2.139	2.131	1.332	1.374
	2.159	2.108	2.148	2.149	1.252	1.559
	2.129	2.193	2.126	2.351	1.337	1.350

Tabela 10- Valores originais obtidos pelo ensaio de biomassa total (coloração CV), após os biofilmes multi-espécies serem submetidos a uma e três aplicações da PDT. Os biofilme foram expostos a diferentes concentrações de PDZ (0, 175, 200 mg/L) e presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P175+L-	P200+L-	P175+L+	P200+L+
1 Aplicação de PDT	2.690	2.732	2.752	2.773	2.681	2.439
	2.817	2.692	2.79	2.786	2.810	2.889
	2.817	2.678	2.615	2.576	2.799	2.841
	2.745	2.81	2.871	2.546	2.768	2.865
	2.717	2.699	2.777	2.721	2.730	2.753
	2.817	2.768	2.853	2.756	2.606	2.841
	2.891	2.73	2.641	2.856	2.530	2.740
	2.761	2.589	2.563	2.721	2.828	2.768
	2.678	2.753	2.793	2.721	2.618	2.708
3 Aplicações de PDT	2.476	2.768	2.399	2.771	2.433	2.171
	2.707	2.575	2.639	2.484	2.500	2.353
	2.427	2.417	2.457	2.667	2.353	2.516
	2.703	2.304	2.388	2.323	2.452	2.458
	2.534	2.628	2.586	2.681	2.694	2.223
	2.539	2.593	2.768	2.513	2.703	2.512
	2.281	2.661	2.550	2.728	2.452	2.382
	2.243	2.768	2.611	2.513	2.394	2.158
	2.476	2.628	2.377	2.622	2.194	2.523

As tabelas de 11 a 15 se referem aos resultados obtidos pela PDT mediada pelo FS Curcumina, após a realização dos ensaios de quantificação de colônias (UFC/mL), XTT e biomassa total, para os biofilmes multi-espécies formados pelos períodos de 24 e 48h sobre amostras de resina acrílica para base de prótese.

Tabela 11- Valores da quantificação de colônias de *C. albicans*, transformados em logaritmo na base 10 (Log_{10}), para os biofilmes multi-espécies formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica pelos períodos de 24 e 48h. Os dados foram obtidos após o biofilme ter sido submetido as diferentes concentrações de Cur (80, 100 e 120 μM), na presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P80+L-	P100+L-	P120+L-	P80+L+	P100+L+	P120+L+
Biofilme formado por 24 horas	6.65	6.64	6.55	6.16	6.11	6.37	6.15	5.61
	6.65	6.77	6.37	6.14	5.78	5.30	5.70	6.00
	6.44	6.70	6.59	6.24	6.05	5.33	5.35	5.53
	6.73	6.49	6.28	6.23	6.10	5.33	5.63	6.05
	6.64	6.73	6.11	6.30	6.31	5.29	5.25	6.04
	6.57	6.48	6.15	6.55	6.15	5.18	5.38	5.43
	6.76	6.65	6.53	6.34	5.90	6.11	5.65	5.20
	6.45	6.46	6.33	6.28	6.26	5.21	5.86	5.30
	6.66	6.53	6.26	6.12	6.12	6.44	5.75	5.28
Biofilme formado por 48 horas	6.41	6.35	6.34	6.39	6.21	6.21	6.20	5.50
	6.29	6.47	6.33	6.27	6.26	6.41	6.20	5.63
	6.39	6.30	6.43	6.26	6.18	6.26	6.16	5.58
	6.21	6.37	5.95	6.59	6.26	6.09	6.09	5.44
	6.09	6.11	6.08	5.93	6.23	6.11	6.67	5.27
	6.08	6.54	6.13	5.80	6.16	6.37	5.83	5.53
	6.44	6.40	6.35	6.42	6.37	6.40	6.26	5.67
	6.43	6.44	6.24	6.30	6.14	6.42	6.33	5.51
	6.42	6.44	6.36	6.15	6.23	6.29	6.35	5.32

Tabela 12- Valores da quantificação de colônias de *C. glabrata*, transformados em logaritmo na base 10 (Log_{10}), para os biofilmes multi-espécies formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica pelos períodos de 24 e 48h. Os dados foram obtidos após o biofilme ter sido submetido as diferentes concentrações de Cur (80, 100 e 120 μM), na presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P80+L-	P100+L-	P120+L-	P80+L+	P100+L+	P120+L+
Biofilme formado por 24 horas	6.31	6.57	6.47	6.13	5.98	5.27	5.35	5.09
	6.56	6.73	6.23	6.21	6.12	5.32	5.21	5.28
	6.41	6.37	6.63	6.26	5.88	5.34	5.40	4.96
	6.47	6.51	6.47	6.15	5.79	5.14	5.24	4.89
	6.39	6.57	6.18	6.10	6.09	5.04	5.36	5.33
	6.34	6.10	6.46	6.15	6.23	5.51	5.27	4.93
	6.34	6.30	6.19	6.39	6.14	5.29	5.35	5.45
	6.41	6.28	6.13	6.14	6.01	5.46	5.41	5.20
	6.51	6.14	6.11	6.32	5.86	5.48	5.47	5.19
Biofilme formado por 48 horas	7.01	6.96	6.46	6.58	6.58	5.40	5.78	5.60
	7.08	6.83	6.26	6.18	6.19	5.80	5.75	5.85
	6.40	7.03	6.69	6.65	6.56	5.67	5.83	5.72
	6.53	6.45	6.95	6.24	6.16	5.49	5.85	5.48
	6.89	6.53	6.28	6.78	6.26	5.64	5.43	5.47
	6.08	6.20	6.21	6.64	6.61	5.73	5.42	5.45
	6.47	6.57	6.29	5.79	6.81	5.49	5.58	5.50
	6.83	6.64	6.23	6.69	6.81	5.71	5.43	5.79
	6.15	6.14	6.39	6.57	6.80	5.71	5.72	5.25

Tabela 13- Valores da quantificação de colônias de *S. mutans*, transformados em logaritmo na base 10 (Log_{10}), para os biofilmes multi-espécies formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica pelos períodos de 24 e 48h. Os dados foram obtidos após o biofilme ter sido submetido as diferentes concentrações de Cur (80, 100 e 120 μM), na presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P80+L-	P100+L-	P120+L-	P80+L+	P100+L+	P120+L+
Biofilme formado por 24 horas	7.78	7.94	8.04	7.74	6.82	5.91	6.65	5.67
	7.73	8.05	7.73	7.84	6.71	6.35	5.75	5.75
	7.90	7.75	7.98	7.79	6.78	5.62	5.84	5.66
	7.63	7.72	8.06	7.55	7.66	6.63	6.75	6.58
	7.97	7.93	7.40	7.59	7.55	6.53	5.61	5.77
	7.44	7.58	7.24	7.68	6.79	5.69	5.97	5.64
	7.54	7.73	7.66	7.70	6.43	5.73	5.65	6.50
	7.68	7.65	7.55	7.38	7.16	6.68	5.98	5.89
	7.83	7.71	7.37	7.46	7.33	5.77	6.65	5.85
Biofilme formado por 48 horas	7.24	7.85	6.01	7.25	7.17	5.89	6.11	6.51
	8.51	7.37	7.35	7.28	6.28	5.95	6.36	5.92
	8.57	6.63	7.46	7.15	7.49	6.45	6.33	5.99
	7.11	7.13	7.53	7.47	7.26	6.36	6.37	5.88
	6.14	7.20	7.56	7.85	7.52	6.31	6.17	6.72
	8.76	7.72	7.37	7.16	7.61	6.52	6.30	6.44
	7.26	7.31	7.21	6.32	7.44	6.46	6.33	6.34
	6.51	7.44	6.35	7.30	7.47	6.51	5.96	5.82
	6.43	7.08	7.37	6.89	6.50	5.90	5.95	6.07

Tabela 14- Valores originais obtidos pelo ensaio redução do sal de XTT, para os biofilmes multi-espécies formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica pelos períodos de 24 e 48h. Os dados foram obtidos após o biofilme ter sido submetido as diferentes concentrações de Cur (80, 100 e 120 μ M), na presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P80+L-	P100+L-	P120+L-	P80+L+	P100+L+	P120+L+
Biofilme formado por 24 horas	2.183	2.252	2.367	2.007	1.920	1.454	1.454	1.213
	2.256	1.927	2.236	2.226	1.955	1.473	1.407	1.498
	1.997	2.254	2.278	2.286	2.087	1.302	1.364	1.226
	2.136	2.155	2.108	2.021	1.924	1.398	1.327	1.301
	2.234	2.205	2.156	2.298	2.261	1.420	1.443	1.358
	2.193	2.152	2.145	2.054	1.926	1.441	1.225	1.192
	2.217	2.170	2.184	2.029	1.926	1.463	1.371	1.482
	2.291	2.143	2.139	2.035	1.934	1.457	1.497	1.228
	2.210	2.258	2.176	2.043	1.932	1.351	1.311	1.215
Biofilme formado por 48 horas	2.334	2.376	2.410	2.439	2.315	1.561	1.644	1.570
	2.289	2.589	1.996	2.383	2.401	1.495	1.515	1.567
	2.497	2.582	2.403	2.292	2.479	1.613	1.417	1.427
	2.529	2.696	2.552	2.319	2.274	1.582	1.543	1.569
	2.367	2.332	2.302	2.517	2.164	1.637	1.534	1.407
	2.572	2.340	1.999	2.278	2.497	1.449	1.567	1.570
	2.341	2.201	2.378	2.350	2.461	1.595	1.443	1.539
	2.490	2.234	2.366	2.301	2.411	1.576	1.554	1.579
	2.206	2.362	2.465	2.465	2.332	1.529	1.531	1.491

Tabela 15- Valores originais obtidos pelo ensaio de biomassa total (coloração CV), para os biofilmes multi-espécies formados sobre corpos-de-prova de resina acrílica pelos períodos de 24 e 48h. Os dados foram obtidos após o biofilme ter sido submetido as diferentes concentrações de Cur (80, 100 e 120 μ M), na presença ou ausência da dose de luz 37,5 J/cm².

	P-L-	P-L+	P80+L-	P100+L-	P120+L-	P80+L+	P100+L+	P120+L+
Biofilme formado por 24 horas	2.600	2.322	2.433	2.556	2.275	2.248	2.275	2.011
	2.455	2.377	2.334	2.504	2.210	2.255	2.348	2.194
	2.427	2.449	2.417	2.444	2.398	2.261	2.317	2.258
	2.409	2.334	2.436	2.310	2.442	2.228	2.219	2.114
	2.587	2.569	2.316	2.569	2.493	2.283	2.224	2.321
	2.568	2.522	2.547	2.567	2.417	2.286	2.161	2.156
	2.364	2.328	2.425	2.376	2.393	2.351	2.158	2.006
	2.369	2.496	2.584	2.464	2.481	2.296	2.203	2.197
	2.578	2.455	2.471	2.483	2.456	2.303	2.300	2.200
Biofilme formado por 48 horas	2.833	2.813	2.876	2.806	2.775	2.531	2.604	2.611
	2.846	2.938	2.726	2.796	2.710	2.564	2.573	2.594
	2.820	2.752	2.926	2.616	2.598	2.462	2.533	2.658
	2.808	2.828	2.495	2.879	2.697	2.472	2.633	2.617
	2.773	2.868	2.796	2.857	2.718	2.792	2.630	2.648
	2.752	2.859	2.796	2.806	2.864	2.823	2.635	2.608
	2.761	2.622	2.663	2.794	2.794	2.789	2.671	2.652
	2.703	2.778	2.742	2.798	2.794	2.654	2.614	2.591
	2.782	2.649	2.775	2.833	2.665	2.699	2.644	2.682

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 25 de julho de 2013.

Cristiane Campos Costa Quishida