



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**AMANDA SIQUEIRA FRAGA**

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR  
CURCUMINA LIVRE E ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE  
FERRO SOBRE *Candida* spp. E BIOFILMES DE ESTOMATITE  
PROTÉTICA**

2024

**AMANDA SIQUEIRA FRAGA**

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR  
CURCUMINA LIVRE E ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE  
FERRO SOBRE *Candida* spp. E BIOFILMES DE ESTOMATITE  
PROTÉTICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico

Orientadora: Profa. Tit. Juliana Campos Junqueira

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca do Carmo

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Fraga, Amanda Siqueira

Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por curcumina livre e associada a nanopartículas de ferro sobre *Candida* spp. e biofilmes de estomatite protética / Amanda Siqueira Fraga. - São José dos Campos : [s.n.], 2024. 101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientadora: Juliana Campos Junqueira

Coorientadora: Paulo Henrique Fonseca Do Carmo

1. Terapia fotodinâmica. 2. *Candida*. 3. Curcumina. 4. Biofilme. 5. Estomatite sob prótese. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Do Carmo, Paulo Henrique Fonseca, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

Os resultados obtidos nesta pesquisa ampliam o entendimento sobre a ação da terapia fotodinâmica com o uso da curcumina e das nanopartículas de ferro, permitindo futuros estudos para estratégias inovadoras no desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

The results obtained in this research broaden the understanding of the action of photodynamic therapy with the use of curcumin and iron nanoparticles, allowing future studies for innovative strategies in the development of new antimicrobial therapies.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Tit. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)**

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

**Prof. Dr. Felipe de Camargo Ribeiro**

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Escola Paulista de Medicina

Laboratório Especial de Micologia

**Profa Assoc. Estela Kaminagakura Tango**

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 27 de fevereiro de 2024.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me auxiliaram nessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por me sustentar até aqui, por me ajudar a superar essa jornada, que não foi fácil, mas gratificante. Por ser meu amparo e meu socorro quando eu mais precisei e por não me deixar desistir. Obrigada meu Deus!

À **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus São José dos Campos**, pela oportunidade de realização dos meus cursos de graduação e pós-graduação.

À minha orientadora, **Profa. Tit. Juliana Campos Junqueira**, agradeço todo o respeito, confiança, paciência e ensinamentos cedidos a mim. Agradeço por acreditar que eu seria capaz de realizar essa jornada. Agradeço por me acolher e permitir participar de um grupo tão especial, quanto ao do Laboratório de Microbiologia e Imunologia. Agradeço por me permitir crescer tanto nesses últimos 2 anos. Com grande reconhecimento e admiração, Muito Obrigada!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca do Carmo**, que me ensinou tanto, que foi tão paciente, que abriu esse mundo de possibilidades que é a microbiologia e imunologia para mim, que não importa o dia e a hora sempre está lá para ajudar. Agradeço, Paulo, por tudo que você fez por mim nesses anos de mestrado, você foi mais que um co-orientador foi um amigo.

Ao meu marido, **Rafael Souza Silva**, por ser paciente e sempre estar ao meu lado, por me dar forças e puxar minha orelha quando eu fraquejei. Obrigada por poder dividir com você meus sonhos e mais esta jornada.

A **minha família**, por compartilhar comigo esse desafio e compreender os momentos que não pude estar presente.

Ao, Dr. **Felipe de Camargo Ribeiro** e **Karoline Kristina Kemmerich** da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e a Dra. **Anna Carolina Pinheiro Lage** do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, por enriquecerem meu projeto com o conhecimento, trabalho e dedicação de vocês

Aos colegas do laboratório de microbiologia e imunologia, **Lilian, Miriam, Patrícia, Ganesh, Lívia, Newton e Profa. Liliana** e em especial **Juliana, Evelyn e Maíra**, por sempre serem tão solícitas, pacientes e dividirem seus conhecimentos comigo.

À **prefeitura de São José dos Campos** por entender a importância do nosso estudo e possibilitar a realização da coleta das amostras na UBS Campos de São José.

A todos os **voluntários** que se dispuseram em auxiliar neste trabalho, doando suas amostras para análise.

Enfim, a todos os funcionários do ICT/Unesp, por sempre me ajudarem quando solicitados.

*"Toda vez que eu dou um passo o mundo sai do  
lugar"*

Siba, 2007

## RESUMO

Fraga AS. Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por curcumina livre e associada a nanopartículas de ferro sobre *Candida* spp. e biofilmes de estomatite protética. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

A estomatite protética é uma doença oral que resulta em processo inflamatório crônico da mucosa de suporte de uma prótese dentária, frequentemente associada à infecção por *Candida*. O tratamento da estomatite protética é dificultado pelo desenvolvimento de resistência das cepas de *Candida* aos fármacos antifúngicos. Neste cenário, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) mediada por curcumina livre (CUR) e nanopartículas de ferro revestidas de curcumina (NpFeCUR) sobre *Candida* spp. Para isso, o estudo foi dividido em 2 etapas. Na etapa 1, os efeitos da TFDa mediada por NpFeCUR foi estudado sobre células planctônicas e biofilmes monoespécie da cepa de *C. albicans* SC5314. Após o tratamento com TFDa, as células viáveis foram quantificadas por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados dessa etapa demonstraram que a TFDa mediada por NpFeCUR não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em culturas planctônicas e em biofilmes. Na etapa 2, foi avaliado o efeito da TFDa mediada por CUR sobre biofilmes formados a partir de amostras clínicas de estomatite protética. Essas amostras foram coletadas de 5 pacientes com estomatite protética e analisadas quanto à presença de *Candida* spp. pelo método de Gram e semeadura em Chromagar Candida. As espécies de *Candida* foram identificadas por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF). A seguir, a TFDa foi testada sobre biofilmes monoespécies das espécies de *Candida* isoladas e sobre os biofilmes microcosmos. Após a TFDa, as células viáveis foram determinadas pela contagem de UFC em meios de cultura não seletivo e seletivos para leveduras, estreptococos, estafilococos e estreptococos do grupo *mutans*. Nos resultados da etapa 2, foi encontrada a presença de *Candida* nas amostras clínicas de 3 pacientes (P1, P2 e P3). Nas amostras P1 e P3, foi identificada a espécie *C. dubliniensis*, já na amostra P2 foi encontrada *C. albicans*. Os biofilmes monoespécies dessas cepas apresentaram redução em torno de 3,0 log<sub>10</sub> UFC após o tratamento com TFDa. Para os biofilmes microcosmos, a redução do número de UFC causada pela TFDa variou entre as amostras dos pacientes e os meios de cultura, sendo capaz de inibir o crescimento de microrganismos totais, leveduras, estreptococos, estreptococos do grupo *mutans* e estafilococos. Conclui-se que a TFDa mediada por NpFeCUR não apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*. Já a TFDa mediada por CUR foi eficaz na redução das espécies de *Candida* e biofilmes provenientes de lesões de estomatite protética.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; *Candida albicans*; *Candida dubliniensis*; nanopartículas de ferro; curcumina; biofilmes, estomatite protética

## ABSTRACT

Fraga, AS. *Effects of Curcumin-Mediated Photodynamic Therapy, Alone and Combined with Iron Nanoparticles, on Candida spp. and Prosthetic Stomatitis Biofilms* [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

Prosthetic stomatitis is an oral disease that results in a chronic inflammatory process of the supporting mucosa of a dental prosthesis, often associated with *Candida* infection. The treatment of prosthetic stomatitis is complicated by the development of resistance in *Candida* strains to antifungal drugs. In this scenario, this study aimed to evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) mediated by free curcumin (CUR) and curcumin-coated iron nanoparticles (FeCUR NPs) on *Candida* spp. For this purpose, the study was divided into 2 stages. In stage 1, the effects of aPDT mediated by FeCUR NPs were studied on planktonic cells and monospecies biofilms of the *C. albicans* SC5314 strain. After aPDT treatment, viable cells were quantified by Colony-Forming Units (CFU) counting. The results of this stage demonstrated that aPDT mediated by FeCUR NPs was unable to reduce fungal viability in planktonic cultures and biofilms. In stage 2, the effect of aPDT mediated by CUR on biofilms formed from clinical samples of prosthetic stomatitis was evaluated. These samples were collected from 5 patients with prosthetic stomatitis and analyzed for the presence of *Candida* spp. by Gram staining and seeding on Chromagar *Candida*. *Candida* species were identified using mass spectrometry (MALDI-TOF). Subsequently, aPDT was tested on monospecies biofilms of the isolated *Candida* species and on microcosm biofilms. After aPDT, viable cells were determined by CFU counting on non-selective and selective culture media for yeasts, streptococci, staphylococci, and mutans group streptococci. In the results of stage 2, *Candida* was found in clinical samples from 3 patients (P1, P2, and P3). In P1 and P3 samples, *C. dubliniensis* was identified, while *C. albicans* was found in the P2 sample. Monospecies biofilms of these strains showed a reduction of around 3.0 log<sub>10</sub> CFU after aPDT treatment. For microcosm biofilms, the reduction in CFU caused by aPDT varied between patient samples and culture media, being able to inhibit the growth of total microorganisms, yeasts, streptococci, mutans group streptococci, and staphylococci. It is concluded that aPDT mediated by FeCUR NPs did not exhibit antifungal activity against *C. albicans*. On the other hand, aPDT mediated by CUR was effective in reducing *Candida* species and biofilms from prosthetic stomatitis lesions.

**Keywords:** photodynamic therapy; *Candida albicans*; antifungal therapy; antimicrobial activity; nanoparticles; curcumin

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Gênero <i>Candida</i> e espécies relacionadas .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Candidíase oral.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Candidíase eritematosa crônica - Estomatite protética .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Biofilme e biofilme microcosmos .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Terapia fotodinâmica.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6 Nanopartículas.....</b>	<b>29</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Primeira etapa: efeitos da TDFa mediada por nanopartículas de ferro associadas a curcumina .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.1 Microrganismos.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2 Fotossensibilizador .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.3 Fonte de luz.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.4 Espectroscopia de absorção UV-Vis das NpFeCUR.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.5 Ensaio de susceptibilidade das NpFeCUR.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.6 TFDa em culturas planctônicas de <i>C.albicans</i> SC5314.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.6.1 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i> SC5314 .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.6.2 Fotossensibilização das culturas planctônicas de <i>C. albicans</i> SC5314.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.6.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL).....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.7 TFDa em biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> SC5314.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.7.1 Formação do biofilme de <i>C. albicans</i> SC5314. ....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.7.2 Fotossensibilização do biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> SC5314.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.7.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL).....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.8 Síntese de NPFepEI e NpFeCUR enriquecidas com curcumina.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Segunda etapa: TFDa mediada por curcumina sobre biofilme monoespécie das cepas de <i>Candida</i> spp. das amostras coletadas e biofilme microcosmos .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1 Fotossensibilizador .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.2 Fonte de luz.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.3 Comitê de ética .....</b>	<b>40</b>

4.2.4 População de estudo.....	41
4.2.5 Coleta e caracterização das amostras.....	41
4.2.6 Identificação das amostras por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF).....	42
4.2.7 Ensaio de susceptibilidade das cepas de <i>Candida</i> isoladas à CUR.....	43
4.2.8 Aplicação da TFDa em culturas planctônicas das cepas de <i>Candida</i> isoladas de estomatite protética.....	43
4.2.9 Formação do biofilme monoespécie das cepas de <i>Candida</i> spp. das amostras coletadas.....	44
4.2.10 Fotossensibilização mediada por CUR sobre biofilme microcosmos de estomatite protética.....	45
4.2.10.1 Confecção dos corpos de prova.....	45
4.2.10.2 Formação do biofilme microcosmo.....	45
4.2.10.3 Fotossensibilização do biofilme microcosmo mediada por CUR.....	46
4.2.10.4 Contagem de células viáveis (UFC/mL).....	46
4.3 Análises estatística.....	47
5 RESULTADO.....	47
5.1 Resultados da primeira etapa.....	47
5.1.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis das NpFeCUR.....	47
5.1.2 Ensaio de susceptibilidade das NpFeCUR.....	48
5.1.3 Viabilidade das células planctônicas de <i>C. albicans</i> SC5314 submetidas a TFDa mediada por NpFeCUR.....	48
5.1.4 Viabilidade do biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> SC5314 submetido a TFDa mediada por NpFeCUR.....	49
5.1.5 Viabilidade das células planctônicas e do biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> SC5314 submetido a TFDa mediada por NpFePEI.....	50
5.1.6 Viabilidade das células planctônicas e do biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> SC5314 submetido a TFDa mediada por NpFeCUR+.....	52
5.2 Resultados da segunda etapa.....	54
5.2.1 Identificação das amostras – MALDI-TOF.....	54
5.2.2 Ensaio de susceptibilidade.....	54
5.2.3 Aplicação da TFDa em culturas planctônicas das cepas de <i>Candida</i> isoladas de estomatite protética.....	55

5.2.4 Viabilidade dos biofilmes monoespécies de <i>Candida</i> spp. isoladas das amostras coletadas e submetidos a TFDa mediada por CUR.....	58
5.2.4.1 Viabilidade do biofilme monoespécie de <i>C. dubliniensis</i> P1 submetido a TFDa mediada por CUR.....	58
5.2.4.2 Viabilidade do biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> P2 submetido a TFDa mediada por CUR.....	59
5.2.4.3 Viabilidade do biofilme monoespécie de <i>C. dubliniensis</i> P3 submetido a TFDa mediada por CUR.....	61
5.2.5 Viabilidade microbiana dos biofilmes microcosmos de estomatite protética submetidos a TFDa mediada por CUR .....	63
5.2.5.1 Viabilidade microbiana do biofilme microcosmo da amostra P1 submetido a TFDa mediada por CUR .....	63
5.2.5.2 Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo da amostra P2 submetido a TFDa mediada por CUR .....	68
5.2.5.3 Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo da amostra P3 submetido a TFDa mediada por CUR .....	72
6 DISCUSSÃO .....	76
6.1 Discussão: primeira etapa .....	76
6.2 Discussão: segunda etapa .....	77
7 CONCLUSÃO .....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE .....	95
ANEXO.....	98

## 1 INTRODUÇÃO

A instalação de próteses parciais ou totais em pacientes com edentulismo é necessária para repor os dentes ausentes, recuperando a estética e reestabelecendo as funções do sistema estomatognático, como mastigação e fonética. Por outro lado, a instalação de uma prótese dentária pode acarretar danos à mucosa e aos tecidos de suporte, e resultar em quadros como a candidíase eritematosa crônica, também conhecida como estomatite protética (Contaldo et al., 2019; Hellstein et al., 2019).

A estomatite protética caracteriza-se por uma lesão geralmente assintomática que acomete aproximadamente 75% dos usuários de prótese, estando geralmente relacionada a traumas por inadequações e porosidade da prótese, uso prolongado, higiene deficiente, hipossalivação e alergia ao acrílico pela liberação de monômero residual. De modo concomitante, pode ocorrer colonização fúngica da superfície das próteses acarretando inflamação crônica da mucosa. Essa inflamação é caracterizada por petéquias pontuais, eritemas difusos ou hiperplasia granular restritas as áreas da mucosa cobertas pela prótese, como palato duro e rebordo alveolar. Embora sejam, na maioria das vezes, assintomáticas, alguns pacientes podem apresentar desconforto e sensação de ardência, o que influencia negativamente sua qualidade de vida (Contaldo et al., 2019; Hellstein et al., 2019).

Nesse processo, *Candida albicans* é o agente de maior relevância na origem, manutenção e agravamento da estomatite protética. Entretanto, espécies de *Candida*, como *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*, e espécies relacionadas ao gênero *Candida*, como *Pichia kudriavzevii* (anteriormente descrita como *Candida krusei*) e *Nakaseomyces glabratus* (anteriormente descrita como *Candida glabrata*), também podem estar presentes e atuar como agentes de coinfeção (Contaldo et al., 2019, Coronado-Castellote et al., 2013, Hellstein et al., 2019, Le Bars et al., 2022, Lemos et al., 2003).

Todas essas espécies são consideradas fungos oportunistas, podendo ser encontradas na mucosa bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital e pele de seres humanos desde o nascimento. Em condições nas quais o hospedeiro está saudável, o fungo encontra-se em baixo número sem causar doenças. Entretanto, este

equilíbrio biológico pode ser rompido por fatores como alterações das condições relacionadas ao sistema imune, acarretando aumento na multiplicação das células fúngicas, invasão dos tecidos do hospedeiro e consequente desenvolvimento da candidíase (Naves et al., 2013, Millsop et al., 2016, Hellstein et al., 2019).

A virulência exibida por *Candida* e/ou espécies relacionadas deve-se a sua plasticidade fenotípica e presença de vários fatores de virulência, como a formação de biofilmes (De Barros et al., 2020, Millsop et al., 2016, Talapko et al., 2021). Os biofilmes são comunidades microbianas complexas, de modo que esta organização protege as células fúngicas da ação dos agentes antimicrobianos, tornando as infecções associadas à biofilme um grande desafio clínico (Cauchie et al., 2017, De Barros et al., 2020, Talapko et al., 2021).

Além disso, *Candida* spp. e espécies relacionadas à *Candida* exibem mecanismos específicos de resistência à terapia antimicrobiana convencional que envolve: alterações celulares nos alvos dos agentes antifúngicos, modulação de resposta ao estresse, modificações genômicas e superexpressão de bombas de efluxo. Em conjunto, estes fatores geram desafios na prática clínica e reforçam a importância de se estabelecer novas terapias antifúngicas (Kaur et al., 2023, Lee et al., 2021).

Neste contexto a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) têm assumido papel de destaque. A TFDa atua por meio de processos fotodinâmicos que ocorrem pela atividade de agentes fotossensibilizadores (FS) não tóxicos que, quando excitados por luz, interagem com o oxigênio molecular, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO atuam sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos presentes na superfície e no interior das células microbianas, levando a morte celular (Chen et al., 2022, Warriar et al., 2021).

Centenas de substâncias são atualmente conhecidas como fotossensibilizadores, incluindo corantes, fármacos, cosméticos e compostos naturais, como a curcumina. A curcumina (CUR) é um composto polifenólico extraído do rizoma de *Curcuma longa* Linn, uma planta nativa da Índia e sudeste asiático. Além de ser empregada na culinária como aromatizante e corante alimentar, a CUR também tem aplicação potencial em medicamentos devido às suas propriedades terapêuticas, que incluem efeitos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatórios e antimicrobianos (Hewlings et al., 2017, Santezi et al., 2021).

Em contrapartida, a CUR é hidrofóbica e, portanto, praticamente insolúvel em água. Esta característica limita sua biodisponibilidade e aplicação clínica. Para superar estas limitações, estratégias envolvendo o carreamento da CUR em nanopartículas têm sido empregadas com resultados promissores. As nanopartículas têm se mostrado eficientes para a entrega dirigida de agentes terapêuticos ao aumentar o tempo de circulação do composto incorporado e, conseqüentemente, elevar sua biodisponibilidade no sítio de alvo (De Santana et al., 2020, Trigo-Gutierrez et al., 2021). Assim, vários tipos de nanopartículas metálicas, como ouro, prata e ferro, têm sido investigadas para aplicações clínicas nas áreas biomédicas (Balhaddad et al., 2020, Ghasemi et al., 2021).

Desse modo, a proposta desse estudo foi avaliar os efeitos da TFDa mediada por curcumina livre ou associada às nanopartículas de ferro sobre *Candida* spp., utilizando-se de modelos de estudo *in vitro* em culturas planctônicas e biofilmes provenientes de estomatite protética.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Candida* e espécies relacionadas

O gênero *Candida* apresenta estrutura celular característica dos seres vivos do Reino Fungi, que inclui parede celular de quitina e membrana citoplasmática fosfolipídica. A primeira vez que o gênero *Candida* foi reconhecido como patógeno humano foi em 1839 por Bernhard von Langenbeck, quando a espécie *C. albicans* foi isolada de uma infecção oral de um paciente acometido por tifo (Knoke et al., 2006, Modrzewska et al., 2013, Sachivkina et al., 2021).

As leveduras do gênero *Candida* são encontradas vivendo de forma comensal na microbiota da mucosa do sistema genitourinário e gastrointestinal de 50 a 70% dos indivíduos saudáveis. Na cavidade oral, estima-se que cerca de 45% e 65% das crianças, e 30% e 55% dos adultos, possuam o fungo como parte da microbiota bucal (Millsop et al., 2016, Karajacob et al., 2023). Entretanto, em condições específicas, essas leveduras podem se tornar patogênicas e causarem infecção, o que caracteriza *Candida* como um patógeno oportunista.

Existem aproximadamente 150 espécies de *Candida*, embora apenas uma pequena parcela seja patogênica para os seres humanos. O gênero *Candida* é o mais comum dos fungos encontrados na cavidade oral. Entre as espécies de *Candida* e espécies relacionadas ao gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal estão: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *P. kudriavzevii*, *N. glabratus* e *Meyerozyma guilliermondii* (anteriormente descrita como *Candida guilliermondii*). Em ambas as condições de saúde e doença, *C. albicans* é a espécie de maior relevância em função da sua alta taxa de prevalência e dos seus diversos fatores de patogenicidade, que lhe permitem desenvolver doenças com mais frequência quando comparado as outras espécies (Hu et al., 2019, Karajacob et al., 2023).

A transição de *Candida* do estágio comensal para patogênico está associada, principalmente, com condições de baixa imunidade do hospedeiro. Essas condições incluem pacientes acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência

Adquirida (AIDS), pacientes em tratamento com imunossupressores, portadores de neoplasias e pacientes hospitalizados por períodos prolongados (Pappas et al., 2018).

O gênero *Candida* é relatado como uma das principais causas de septicemia no mundo. No Brasil, *Candida* spp. foi relatado como o sétimo agente etiológico causador das infecções sanguíneas, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente dessas infecções, seguida por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *N. glabratus* (Karajacob et al., 2023, Pappas et al., 2018).

Independentemente da espécie de *Candida* e do nicho do hospedeiro colonizado, esses microrganismos precisam ultrapassar as barreiras de resistência mecânicas, como o tecido epitelial, para infectar o hospedeiro. Adicionalmente, as leveduras enfrentam barreiras bioquímicas e físico-químicas, como pH extremos e produção de muco, além da imunidade inata e adquirida (Contaldo et al., 2023, Polke et al., 2015). Os mecanismos utilizados pelas espécies do gênero *Candida* para evadir o sistema imune, invadir e infectar o hospedeiro (fatores de virulência) são: expressão de adesinas e invasinas, secreção de enzimas hidrolíticas, transição pleomorfica e formação de biofilme (Contaldo et al., 2023).

A adesão de *Candida* spp. às células do hospedeiro constitui uma fase inicial e imprescindível para a colonização, formação de biofilme e dano aos tecidos do hospedeiro. A adesão às células epiteliais é um processo complexo, dinâmico e multifatorial definido pela íntima associação entre os componentes da parede celular fúngica e as proteínas da superfície epitelial. As interações iniciais entre *Candida* spp. e o epitélio do hospedeiro ocorrem através de processos de atração hidrofóbica e eletrostática. Além disso, a presença de receptores específicos na parede da célula fúngica, denominados adesinas, são essenciais nesse processo (Chen et al., 2020, Richardson et al., 2018).

As adesinas ligam-se à glicoproteínas na superfície da célula epitelial, aderindo-se, assim, à mucosa. Dois grupos de adesinas fundamentais na adesão foram descritos: *Hyphal wall protein 1* (Hwp1), uma proteína da superfície celular expressa apenas nas hifas e *agglutinin-like sequences* (Als) uma adesina expressa principalmente nas leveduras, mas que também ocorre nas hifas. Além de participarem do processo de adesão, Hwp1 e Als têm papel crucial no processo de formação de biofilme em *C. albicans*. Homólogos de proteínas Als também foram

identificados em *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. A deleção de um homólogo de Als3p de *C. albicans* em *C. parapsilosis* resultou em adesão reduzida às células epiteliais bucais *in vitro* e patogenicidade diminuída em um modelo murino (Cauchie et al., 2017, Chen et al., 2020, Richardson et al., 2018).

De modo concomitante, as invasinas interagem com E-caderina, um receptor epitelial do hospedeiro. Essa interação promove o acúmulo e a ativação de proteínas que regulam o remodelamento do citoesqueleto do fagócito e ativam a actina para fagocitar o fungo. Como consequência, *C. albicans* pode entrar nas células do hospedeiro por um processo passivo caracterizado como endocitose induzida. As invasinas também medeiam o processo de penetração ativa das hifas no epitélio estratificado das mucosas. Essas proteínas degradam componentes da membrana plasmática das células epiteliais das camadas mais superficiais para invasão ao epitélio mais profundo da mucosa (Richardson et al., 2018).

Uma vez em contato com o epitélio, algumas espécies de *Candida* sofrem mudança morfológica de levedura para hifa, e essa transição morfológica representa uma característica importante na virulência, apesar de não ser essencial. Por exemplo, enquanto *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* formam hifas, que aderem mais fortemente às células epiteliais, a espécie *N. glabratus* não forma hifas, mas mesmo assim possui capacidade de adesão e infecção (Chen et al., 2020, Mane et al., 2011, Richardson et al., 2018).

A transição pleomórfica é um fator importante relacionado à invasão dos tecidos do hospedeiro. Quando em comensalismo com os tecidos do hospedeiro, *C. albicans* se apresenta sob a forma de levedura, induzindo resposta imune inata e adaptativa e gerando uma memória imunológica. Durante o processo de infecção, as leveduras de *C. albicans* passam a apresentar um crescimento filamentoso, promovendo a formação de hifas ou pseudo-hifas. Então, a resposta imune passa a ser ineficiente contra *C. albicans* e a memória imunológica não reconhece o fungo sob a forma de hifa, configurando uma evasão à resposta imune do hospedeiro. Ambas as formas do fungo estão presentes na maioria das lesões de candidíase, sugerindo que elas desempenhem funções importantes no desenvolvimento e progressão da doença (Cassone et al., 2023, Wang et al., 2015).

A transição de leveduras para hifas é um fator chave na defesa de *C. albicans* frente ao ataque das células fagocíticas do hospedeiro. O ambiente do

fagossoma estimula a formação de hifas das leveduras fagocitadas, o que pode perfurar os macrófagos, provocar a lise dessas células e auxiliar na evasão do sistema fagocítico (Bradford et al., 2017, Cassone et al., 2023).

Enzimas como fosfolipase, hemolisinas e proteases também possuem importante papel na patogênese de *Candida*. A produção de fosfolipases é dependente da espécie e sua expressão contribui para adesão e danos à célula do hospedeiro. A secreção de fosfolipase por *C. albicans* é considerada um atributo chave para a invasão da mucosa epitelial, visto que essas enzimas catalisam a hidrólise de fosfolipídios. As lipases, por sua vez, estão envolvidas na adesão e dano aos tecidos do hospedeiro (Bradford et al., 2017, Cauchie et al., 2017).

As hemolisinas são enzimas importantes para a invasão do tecido e aquisição de nutrientes. A aquisição de ferro é crucial para a sobrevivência de *Candida* spp. e a secreção de hemolisinas é importante para a degradação da hemoglobina e captação do ferro, o que facilita a invasão aos tecidos mais profundos (El-baz et al., 2021, Richardson et al., 2018).

As aspartil-proteases secretadas (Sap) formam uma família de 10 isoenzimas (Sap1-10) que participam do processo de infecção, degradando diversas proteínas da célula hospedeira, como imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e matriz extracelular. Assim, há dano tecidual e consequente invasão do microrganismo. Em geral, as Sap são ativadas e expressam sua atividade proteolítica quando o pH do ambiente é ácido. A produção e secreção de proteases por *C. albicans* foi descrita pela primeira vez em 1965 e, desde então, vem sendo intensamente estudada por ser considerada um fator importante na patogenicidade de *Candida*. Essas enzimas desempenham diferentes papéis dependendo dos estímulos ambientais e estão envolvidas na resposta inflamatória do hospedeiro ao fungo (Cassone et al., 2015, Kulshrestha et al., 2023).

Schaller et al. (2005) realizaram um estudo utilizando um modelo de candidíase vaginal *in vitro* e observaram que a infecção por *C. albicans* em camundongos induziu a produção de interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, fator de estimulação de colônia de macrófago, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando comparado a expressão de citocinas nos tecidos não infectados. Além disso, quando adicionado o inibidor de aspartil protease (Pepstatina A), houve uma redução da resposta das

citocinas no tecido infectado, indicando que a resposta imune é afetada pela atividade proteolítica do agente patogênico.

Um dos principais mecanismos de virulência de *Candida* spp. é a formação de comunidades microbianas aderidas a diversas superfícies, denominadas biofilmes. O biofilme é uma comunidade microbiana caracterizada pela organização de células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato ou interface e embebidas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas que as próprias células produzem. Estas comunidades microbianas assumem grande importância no contexto clínico porque estão associadas a persistência dos microrganismos nos processos infecciosos (Pereira et al., 2021).

Microrganismos em biofilmes possuem atributos distintos das células planctônicas, como menor taxa de crescimento e maior resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento. São responsáveis por boa parte dos casos de resistência aos antimicrobianos, pois sua tolerância pode ser 1.000 vezes maior que a concentração inibitória para células planctônicas. As maiores vantagens dos microrganismos se organizarem nestas comunidades consistem na maior capacidade de captação de nutrientes, no favorecimento de crescimento mais ordenado e na maior proteção contra radiação ultravioleta, fagocitose, desidratação e resistência a antimicrobianos (Cavalheiro et al., 2018, Pereira et al., 2021).

## **2.2 Candidíase oral**

Os termos Candidíase ou Candidose referem-se ao processo infeccioso causado pelos fungos do gênero *Candida*. As manifestações da doença variam de acordo com o sítio anatômico acometido (Melo et al., 2014). Essa doença, frequentemente, se desenvolve na presença de fatores que comprometam a imunidade. Uma variedade de condições sistêmicas, tais como leucemia, desnutrição, neutropenia, uso de corticoides, quimioterapia, radioterapia e AIDS podem favorecer o comprometimento da imunidade. Além disso, fatores locais como xerostomia, uso de próteses e de corticosteroides inalatórios podem causar um

supercrescimento de *Candida*, e conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento da candidíase oral (Lopes et al., 2022, Millsop et al., 2016).

A espécie *C. albicans* é etiologicamente o agente mais comum associado a infecções fúngicas orais e corresponde aproximadamente a 80% de todos os microrganismos isolados das lesões orais. Entretanto, um aumento na frequência de infecções orais causadas por espécies de *Candida* e espécies relacionadas ao gênero *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *P. kudriavzevii*, *M. guilliermondii* e *N. glabratus* tem sido observado na última década (Javed et al., 2014, Zhang et al., 2016). Estudos clínicos demonstraram que *C. albicans* e *N. glabratus* são isolados comuns de infecções orais, de modo que *N. glabratus* está geralmente associada a coinfeções com outros microrganismos (Tati et al., 2016, Karajacob et al., 2023).

A candidíase oral apresenta variadas manifestações clínicas. Em geral, a candidíase oral pode ser dividida em duas grandes categorias: candidíase oral primária e candidíase oral secundária. As infecções por *Candida* spp. confinadas aos tecidos orais e periorais são considerados como candidíase oral primária, enquanto a candidíase oral manifestada de forma generalizada é categorizada como candidíase oral secundária (Hellstein et al., 2019). A candidíase oral primária é subdividida em três grandes variantes: candidíase pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica. Há um grupo de doenças que são chamadas de lesões associadas à *Candida* spp., sendo essas a queilite angular, glossite romboide mediana e candidíase mucocutânea crônica (Hellstein et al., 2019).

A candidíase pseudomembranosa é uma infecção aguda caracterizada pela presença de uma pseudomembrana espessa e aveludada de cor branca/amarelada ou por placas individuais nos tecidos orofaríngeos. Estas pseudomembranas ou placas podem ser removidas à raspagem, deixando uma base eritematosa e dolorosa que prontamente sangra. A candidíase pseudomembranosa afeta aproximadamente 5% dos recém-nascidos e 10% dos idosos debilitados. O local mais frequentemente acometido é a mucosa oral, mas todo o tecido orofaríngeo pode ser afetado. A candidíase pseudomembranosa é frequentemente observada em recém-nascidos, em pacientes imunocomprometidos ou que estão em tratamento com imunossupressores (Vila et al., 2020). Nesses casos, a análise histológica revela leveduras predominantemente localizadas entre as células

epiteliais descamadas e desprendidas, crescimento de hifas em direção as células epiteliais frouxas, deformação da membrana do epitélio e citoesqueleto, e formação de invaginação das células epiteliais ao redor das hifas (Hotta et al., 2019).

A candidíase eritematosa é historicamente conhecida como “boca ferida por antibióticos”, pois ocorre frequentemente como consequência da disbiose decorrente do uso de antibióticos de amplo espectro, o que facilita o crescimento excessivo de *Candida* spp. A candidíase eritematosa pode surgir como consequência da candidíase pseudomembranosa aguda persistente (Lewis et al., 2017, Hellstein et al., 2019, Vila et al., 2020). O exame clínico evidencia mucosa eritematosa e ausência de pseudomembrana, enquanto as lesões podem ser localizadas ou generalizadas. A natureza dolorosa das lesões é o que faz com que o paciente procure atendimento, já que eles se queixam de sensação aguda de queimação na cavidade oral e aumento da sensibilidade a vários alimentos e aromatizantes (Lewis et al., 2017, Hellstein et al., 2019, Vila et al., 2020).

A candidíase eritematosa crônica apresenta-se de forma semelhante e em decorrência da forma aguda. A forma mais prevalente de candidíase eritematosa crônica é a estomatite protética associada à *Candida* spp. Nesse caso, observa-se uma área eritematosa da mucosa palatina portadora da prótese (Hellstein et al., 2019, Vila et al., 2020). A estomatite protética é observada em até 75% dos usuários de próteses e, muitas vezes, não há sintomas clínicos. Inadequada higiene da prótese, próteses mal ajustadas ou uso contínuo de próteses, especialmente noturno, são os principais fatores predisponentes do hospedeiro à estomatite protética. Nestas condições, juntamente com o limitado fluxo de saliva neste local, a área estagnada sob a prótese proporciona um ambiente ideal para o crescimento de *Candida* spp. Além disso, o material acrílico abiótico atua como um reservatório crônico permitindo a semeadura contínua de *Candida* spp. no tecido palatino, o que, por sua vez, provoca uma resposta inflamatória local que se manifesta clinicamente como um tecido eritematoso e hiperplásico. Dada a propensão da *Candida* spp. em aderir e colonizar a prótese, esta condição é considerada uma infecção clássica associada ao biofilme de *Candida*. De fato, *Candida* spp. é encontrada mais frequentemente na superfície da prótese do que na mucosa palatina associada, e portanto, o manejo clínico é focado principalmente na erradicação do biofilme

formado na prótese para prevenir a recolonização e reinfecção (El-Sakhawy et al., 2023; Jabra-Rizk et al., 2016, Lewis et al., 2017).

A candidíase hiperplásica é uma lesão caracterizada por placas brancas aderentes à mucosa que não são facilmente removidas pela raspagem. Clinicamente, a lesão crônica hiperplásica apresenta-se de forma bem circunscrita, pouco elevada e palpável. Elas variam de pequenas áreas esbranquiçadas translúcidas a grandes placas opacas, com perfil semelhante as lesões de leucoplasia. Comumente localiza-se na mucosa jugal, podendo envolver a comissura labial e borda lateral da língua. A candidíase hiperplásica apresenta-se de forma crônica e assintomática, estando amplamente correlacionada ao etilismo e ao tabagismo (Millsop et al., 2016, Lewis et al., 2017, Hellstein et al., 2019).

Histopatologicamente, a candidíase hiperplásica apresenta um crescimento desordenado de células com potencial para transformação em neoplasias malignas. Apesar da falta de estudo epidemiológico em relação à sua taxa de transformação maligna, existem evidências clínicas substanciais que demonstram que o potencial de malignização da candidíase hiperplásica é maior do que aquele de leucoplasia oral (Lewis et al., 2017, El-Sakhawy et al., 2023). Os estudos atuais buscam identificar se a invasão de *Candida* ao tecido epitelial da mucosa é o fator etiológico primário da candidíase hiperplásica, ou se há uma infecção secundária de *Candida* a uma lesão leucoplásica já existente. Para o diagnóstico diferencial entre candidíase hiperplásica e leucoplasia, realiza-se o tratamento com antifúngico. Caso a lesão regrida, o diagnóstico pode ser confirmado como primário, ou seja, como candidíase hiperplásica. Em caso de não regressão da lesão, há a necessidade de se realizar a biópsia incisional para avaliação de displasia epitelial e risco de transformação maligna (Hellstein et al., 2019, El-Sakhawy et al., 2023).

A queilite angular caracteriza-se por eritema, fissuras e descamação envolvendo as comissuras labiais, comum em pessoas idosas com perda da dimensão vertical de oclusão e sulcos acentuados nas comissuras. A saliva tende a se acumular nessas áreas, mantendo-as úmidas e propiciando a infecção microbiana. Nesses casos, espécies de *Candida*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus* podem estar envolvidos em processos de infecção e coinfeção entre os diferentes microrganismos. Em situações pouco comuns, pode haver envolvimento da pele perioral, geralmente devido à hábitos que mantêm a pele úmida como lambe o lábio

ou chupar o dedo, criando um padrão clínico denominado de queilocandidíase (Lu et al., 2016, Hellstein et al., 2019, Lu et al., 2021).

A glossite romboide mediana é caracterizada por atrofia papilar central que se apresenta como uma área central elíptica ou rombóide de atrofia e eritema da linha média do dorso posterior da língua, anterior às papilas circunvaladas. Uma biópsia dessa lesão geralmente apresenta *Candida* em mais de 85% dos casos (Lu et al., 2016, Lu et al., 2021).

A candidíase mucocutânea crônica tem etiologia multifatorial, envolvendo a interação de fatores genéticos, hormonais e imunológicos. As lesões da cavidade bucal aparecem na forma de queilite angular ou candidíase hiperplásica e geralmente ocorrem em pacientes com doenças relacionadas à imunossupressão, como diabetes *mellitus*, neutropenia, endocrinopatia ou HIV/AIDS (Lu et al., 2021).

No presente trabalho, o enfoque será dado a candidíase eritematosa crônica ou estomatite protética devido a sua elevada prevalência em pacientes usuários de próteses totais ou parciais, a dificuldade de tratamento e a recalcitrância das infecções por *Candida*.

### **2.3 Candidíase eritematosa crônica (Estomatite protética)**

A estomatite protética é a alteração que acomete a mucosa de suporte das próteses removíveis (parciais ou totais) e que se caracteriza por hiperemia, edema, congestão, acompanhados algumas vezes por petéquias. O processo raramente é sintomático, e em alguns casos, pode acarretar inflamação moderada ou intensa da mucosa (Batista et al., 1999, Galvan et al., 2021). A estomatite protética, geralmente, está associada a infecções por *Candida*, determinando a chamada candidíase eritematosa, denominada por diversos autores como estomatite por dentadura, estomatite por *Candida* ou candidíase atrófica crônica (Lemos et al., 2003, Martorano et al., 2020).

A etiologia da estomatite protética é multifatorial, podendo estar relacionada a fatores locais como trauma provocado pela prótese e à infecção por *Candida*. Na prática, esses são os agentes causais mais significantes da estomatite protética, já

que eles estão envolvidos na origem, manutenção e agravamento da doença (Batista et al., 1999, Martorano et al., 2020, Galvan et al., 2021). Essa doença foi classificada por Newton em 1962 em três tipos, com base no aspecto clínico, distribuição e extensão da lesão. No Tipo I, encontram-se lesões hiperêmicas localizadas, representativas de uma inflamação localizada simples; no Tipo II, há um eritema difuso confinado ao contato com a prótese representativo de uma inflamação simples generalizada; no Tipo III, observa-se a presença de uma mucosa hiperêmica associada à superfície granular, característico de hiperplasia inflamatória (Hannah et al., 2017).

A estomatite protética tem sido considerada a lesão bucal mais frequentemente observada em usuários de próteses removíveis, apresentando uma prevalência de 60 a 72% nessa população (Webb et al., 2005, Hannah et al., 2017, Galvan et al., 2021). Arnaud et al. (2012) estudaram a prevalência da estomatite protética em pacientes com idade média entre 25 e 87 anos e observaram maior prevalência em mulheres (77%). Além disso, a faixa etária mais acometida foi a de 51 a 60 anos. Quanto ao tipo de prótese, 59% dos pacientes usavam prótese parcial removível e 41% prótese total. Dessa forma, a estomatite protética apresentou associação, estatisticamente significativa, com idade, gênero e tipo de prótese utilizada.

As candidíases associadas à estomatite protética são de difícil tratamento, sendo comum a ocorrência de recidivas após a interrupção do tratamento, mesmo em situações em que o trauma causado pela prótese tenha sido eliminado por meio da substituição por nova prótese (Hanna et al., 2017, Galvan et al., 2021).

Além disso, em um cenário em que se observa um aumento da expectativa de vida, a necessidade de próteses muco suportadas tende a persistir em virtude das limitações impostas pelas condições de saúde e até mesmo econômicas dos pacientes. Portanto, a estomatite protética pode continuar a ser uma doença de elevada prevalência para esse público e um desafio clínico para os cirurgiões dentistas (Oliveira et al., 2007, Galvan et al., 2021).

## **2.4 Biofilme e biofilme microcosmos**

Os biofilmes representam uma comunidade de microrganismos que estão unidos por uma estrutura formada por polímeros extracelulares sobre uma determinada superfície, biótica ou abiótica. Portanto, na cavidade bucal, as leveduras do gênero *Candida* podem formar biofilmes tanto nas superfícies da mucosa, como nas superfícies das próteses dentárias. Quando em biofilmes, os microrganismos apresentam maior resistência a terapia antimicrobiana, comportando-se de forma muito diferente das células planctônicas (Yao et al., 2022).

Microrganismos associados em biofilmes possuem diferentes atributos de seus pares planctônicos, como menor taxa de crescimento e maior resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento. Eles são responsáveis por boa parte dos casos de resistência aos tratamentos convencionais, pois sua tolerância pode chegar a superar uma concentração mil vezes maior que a maior concentração testada em células planctônicas. Estima-se que no mínimo 80% dos microrganismos existentes vivam em biofilmes, o que torna importante compreender e explorar tais estruturas (Cavalheiro et al., 2018). Na pesquisa, os biofilmes podem ser analisados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* envolvem fatores bem regulados, mas que os distanciam das situações reais em que ocorrem no hospedeiro. Em contrapartida, os estudos *in vivo* exigem modelos experimentais bem definidos, que levam em consideração o microambiente e a fisiologia do hospedeiro. Neste cenário, uma alternativa de modelo é o biofilme microcosmo (Araújo et al., 2022, Méndez et al., 2018).

O biofilme microcosmo é um modelo de estudo empregado no intuito de suprir as limitações do estudo *in vitro* devido a sua capacidade de reproduzir em condições laboratoriais a biodiversidade, o pH e as relações ecológicas dos biofilmes da cavidade oral humana. Para tanto, o biofilme é estabelecido a partir de material biológico coletado de um sítio de infecção, representando a biodiversidade do biofilme caracterizada pela presença de microrganismos de diferentes espécies ou mesmo de diferentes reinos, como bactérias e fungos (Araújo et al., 2022, Lebeaux et al., 2013, Méndez et al., 2018).

Cusicanqui et al (2018) utilizaram biofilme microcosmos de cárie para avaliar a eficácia da TFDa associada a CUR. Nesse estudo, os autores demonstraram que a TFD mediada por CUR foi eficaz na redução da viabilidade e da vitalidade de biofilmes microcosmos de cárie dentária.

Araújo et al (2022) utilizaram o biofilme microcosmos obtidos de estomatite protética associadas a *Candida*, para estudar os efeitos antimicrobianos da quitosana em biofilmes microcosmos de candidíase oral, mostrando que os efeitos antibiofilme da quitosana tem grande potencial para melhorar a condição clínica de pacientes com estomatite protética, e formulações contendo este polímero natural podem ser úteis no controle da candidíase oral.

Garcia et al (2021) utilizaram biofilme microcosmos de cárie dentária para o estudo da TFDa com o uso de fotoentocina e observaram atividade antimicrobiana contra biofilme microcosmos de cárie dentária. A TFDa mediada por fotoentocina levou a reduções significativas no total de microrganismos, estreptococos, estreptococos do grupo *mutans*, lactobacilos e leveduras.

O uso dos biofilmes microcosmos tem criado novas possibilidades de estudo das relações dos microrganismos enquanto comunidade e, sobretudo, para avaliar os papéis dos tratamentos frente a essa diversidade microbiológica. Haja visto que os estudos com biofilmes monoespécie já foram bastante explorados e não são capazes de reproduzir a real situação e a dinâmica de um biofilme *in vivo*, os biofilmes microcosmos têm potencial para solucionar essas limitações.

## 2.5 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) ou terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) baseia-se em três componentes: fotossensibilizador, radiação não ionizante e oxigênio molecular. Para que TFDa seja eficaz, o fotossensibilizador precisa ser absorvido pelo microrganismo e exposto a radiação não ionizante (em comprimento de onda e dose específicos) na presença de oxigênio. Como consequência da absorção da energia da radiação, o fotossensibilizador é excitado e o seu excesso de energia é transferido para o oxigênio, produzindo radicais livres denominados ERO. Em geral, o efeito antimicrobiano induzido pela TFDa ocorre por danos em moléculas importantes para as células (lipídios da membrana, proteínas e ácidos nucleicos) devido a produção de ERO (Chen et al., 2022, Da Fonseca et al., 2021)

A TFDa tem se demonstrando um método eficaz na eliminação seletiva de microrganismos, o que minimiza os danos às células dos hospedeiros. Além disso, a TFDa apresenta como vantagem a baixa probabilidade de indução de resistência microbiana por apresentar múltiplos alvos de ação. Em *C. albicans*, a TFDa demonstrou atividade antifúngica, sobretudo contra cepas resistentes aos antifúngicos azóis (De Carvalho et al., 2019, Kanpittaya et al., 2021).

A eficácia da TFD é dependente da escolha de um FS apropriado. As características de um FS adequado para a TFD envolvem baixa toxicidade, alto rendimento quântico de oxigênio e amplo espectro de ação antimicrobiana. É importante que o FS exiba baixo potencial mutagênico, ausência de toxicidade no escuro e baixa afinidade pelas células do hospedeiro (Kanpittaya et al., 2021, Tim et al., 2015).

Diversas substâncias são atualmente conhecidas como fotossensibilizadores, incluindo corantes, drogas, e compostos naturais, como a curcumina (CUR). CUR é um pigmento polifenólico da raiz de *Curcuma longa* Linn, pertencente à família das zingiberáceas, amplamente cultivada em zonas tropicais da Ásia. A curcuma é comumente utilizada como especiaria, mas também tem aplicação potencial em medicamentos devido às suas propriedades terapêuticas, que incluem efeitos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatórios e antimicrobianos (Ferrisse et al., 2022, Pinto et al., 2016)

Cerca de 2-8% do peso da curcuma é CUR. A CUR e alguns dos seus análogos são responsáveis pela cor amarela brilhante. Embora a estrutura química da CUR seja conhecida desde 1913, suas propriedades biológicas foram registradas apenas na década de 1970. A CUR modula uma série de alvos celulares, incluindo fatores de crescimento, fatores de transcrição, citocinas, enzimas e genes que regulam a proliferação e a apoptose. Farmacologicamente, a CUR é segura mesmo numa dose de 8 g/dia. No entanto, a principal limitação do potencial terapêutico da CUR é a sua reduzida solubilidade em água e a baixa biodisponibilidade. A CUR é praticamente insolúvel em água a pH 7, embora seja parcialmente solúvel em água alcalina. Por outro lado, ela é facilmente solúvel em solventes como metanol, etanol, dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) (Laubach et al., 2019).

A CUR apresenta fototoxicidade para microrganismos, que é mediada pelos estados excitados da curcumina e pelas suas subseqüentes reações com o

oxigênio. A CUR possui comportamento de fotossensibilizador devido à sua capacidade de absorver luz no espectro azul em comprimento de onda na faixa de 408-434 nm e levar a produção de ERO que danificam as células microbianas (Ferrisse et al., 2022, Santezi et al., 2021).

Shahmoradi et al (2023) observaram que TFDa mediada por CUR sobre *Porphyromonas gingivalis* reduziu significativamente o crescimento bacteriano em comparação com o grupo não tratado, concluindo que a técnica pode ser uma abordagem útil para erradicar infecções por *P. gingivalis*. Ribeiro et al (2022) realizaram um estudo em que a TFDa com CUR diminuiu o crescimento do biofilme da cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, tornando-se uma possível alternativa para a inativação ou tratamento de infecções causadas por essa cepa.

## 2.6 Nanopartículas

As nanopartículas são partículas que possuem uma dimensão entre 1 nm e 100 nm, de origem orgânica ou inorgânica, sendo geralmente classificadas com base nos materiais utilizados para sua síntese. A redução no volume faz com que as nanopartículas apresentem vantagens e propriedades físico-químicas únicas que incluem maior reatividade, maior solubilidade, recursos biomiméticos e a capacidade de carrear outros materiais, como fármacos, moléculas bioativas e fotossensibilizadores (Najahi et al., 2020, Wong et al., 2021).

O campo da nanotecnologia evoluiu muito na última década e diversos produtos contendo nanopartículas têm sido aplicados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Muitas nanopartículas orgânicas ou inorgânicas estão sendo testadas em estudos clínicos e pré-clínicos, com o objetivo de melhorar a entrega de drogas. Muitas drogas com eficácia terapêutica apresentam baixa solubilidade aquosa e seu carreamento em nanopartículas pode melhorar sua estabilidade, minimizando a precipitação e reduzindo a necessidade de solventes tóxicos (Najahi et al., 2020, Meena et al., 2021).

As nanopartículas podem ser categorizadas como poliméricas, lipídicas ou metálicas. Entre as metálicas, destacam-se as nanopartículas de óxido de ferro,

ouro e prata. As nanopartículas de óxido de ferro possuem propriedades superparamagnéticas, alta estabilidade química e térmica, e baixo custo. Essas características fazem com que sejam estudadas como sistemas de liberação de medicamentos para aumentar a eficácia e reduzir as concentrações terapêuticas necessárias. Além disso, elas têm sido utilizadas em biossensores em combinação com ressonância magnética e hipertermia de fluido magnético para o tratamento do câncer (Arias et al., 2020, Carmo et al., 2023, Imran et al., 2022).

Na prática, o ferumoxitol é um exemplo do uso de nanopartículas de ferro nas áreas biomédicas. Aprovado pelo FDA, Health Canadá e outras agências regulatórias, o ferumoxitol é uma formulação intravenosa de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas utilizadas no tratamento de anemia em pacientes com doença renal crônica. Além de exibir resultados promissores no tratamento na anemia, o ferumoxitol exibe um bom perfil de segurança (Huang et al., 2022, Lu et al., 2010)

Além disso, as nanopartículas de ferro têm demonstrado atividade potencial contra espécies de fungos de interesse nas áreas médicas e farmacêuticas. As nanopartículas de ferro atuam como um cofator para ativação de enzimas celulares e geração de ERO que, por meio do estresse oxidativo, acarretam danos à membrana e parede celular dos microrganismos. Adicionalmente, pode haver inibição da atividade enzimática, diminuição dos níveis de ATP, alterações no DNA e disfunção mitocondrial. Diferentes compostos orgânicos e inorgânicos podem ser conjugados para modificar as propriedades gerais das nanopartículas de ferro, em especial suas propriedades antimicrobianas (Carmo et al., 2023, Imran et al., 2022).

Khatoon et al (2019) avaliaram a atividade antifúngica das nanopartículas de prata contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e observaram que sua eficácia contra as três espécies de *Candida*. Com base nesse estudo, os autores sugerem que as nanopartículas têm potencial para atuar como antifúngicos e podem desempenhar um papel crucial no manejo de infecções por *Candida*.

Em outro estudo, Lima et al. (2020) sintetizaram nanopartículas de ferro funcionalizadas com quitosana como nanocarreadores para o antifúngico fluconazol (IONPs-CS-FLZ). O nanossistema IONPs-CS-FLZ inibiu as células planctônicas de *Candida*, sendo mais eficaz que o fluconazol livre. Esse nanossistema ainda mostrou efeitos antibiofilmes semelhantes ao fluconazol.

Vários estudos também têm utilizado as nanopartículas para carrear fotossensibilizadores na TFDa. Nanopartículas de ouro conjugadas com azul de metileno e azul de toluidina apresentaram efeito antimicrobiano contra células planctônicas de *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* (Bekmukhametova et al., 2020, Sherwani et al., 2015). Nanopartículas de ouro modificadas com quitosana e conjugadas com rosa bengala e piridil porfirina exibiram efeitos inibitórios contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* (Bekmukhametova et al., 2020, Thakur et al., 2017).

Estudos demonstraram que as nanopartículas carregadas com substâncias antimicrobianas podem penetrar melhor nos biofilmes, sendo potentes em menores doses dos antimicrobianos (Beyth et al., 2015, Hemeg et al., 2022). Além dessas vantagens, as nanopartículas permanecem no corpo por mais tempo, suprimindo as substâncias tóxicas produzidas pelo microrganismo e minimizando o surgimento de cepas resistentes. A possibilidade de aplicação em vários tipos de moléculas, e o fato de as nanopartículas serem biodegradáveis, não imunogênicas, não inflamatórias e não mutagênicas aumentam sua versatilidade de uso nas áreas biomédicas, e sobretudo, nas terapias antimicrobianas (Balhaddad et al., 2020, Ghasemi et al., 2021).

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica da curcumina livre e associada as nanopartículas de ferro como fotossensibilizadores da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) sobre *Candida* spp.

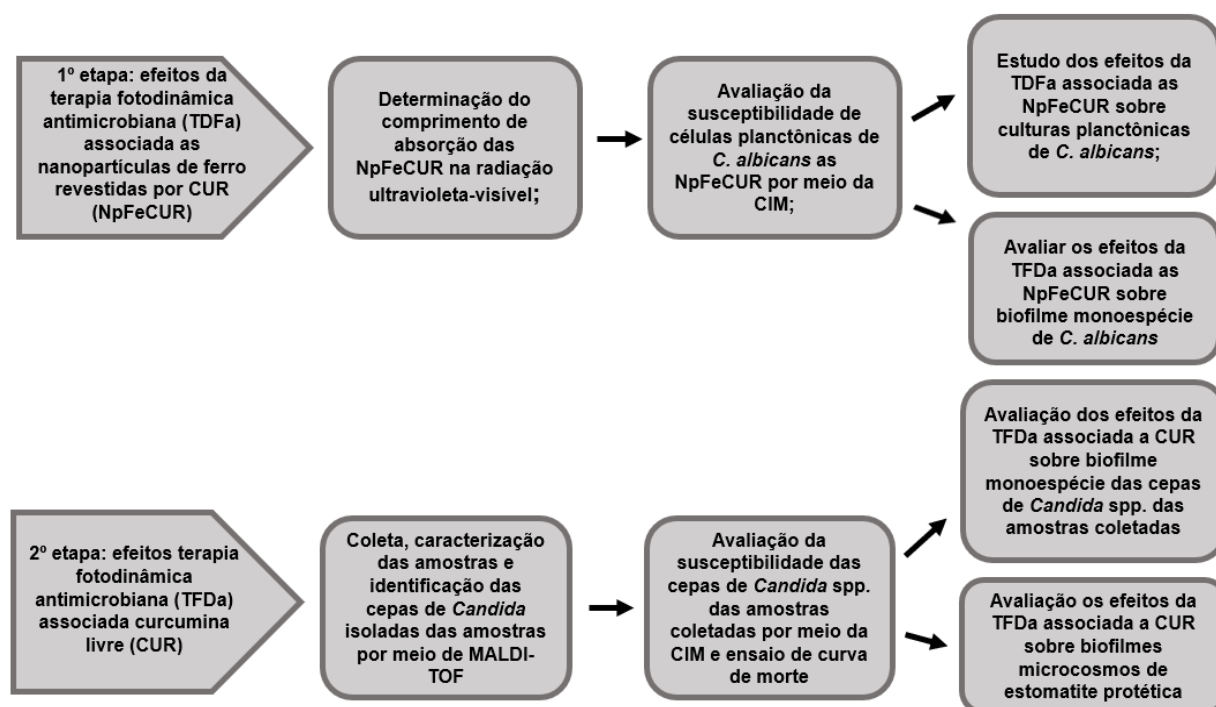
#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos da TFDa mediada por nanopartículas de ferro revestidas por curcumina (NpFeCUR) sobre *C. albicans* em culturas planctônicas e biofilmes monoespécies;
- b) Verificar a ação da TFDa mediada por curcumina livre (CUR) sobre espécies de *Candida* e biofilmes provenientes de pacientes com estomatite protética.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas. Enquanto a primeira etapa contemplou a análise da TFDa mediada por nanopartículas de ferro revestidas por curcumina (NpFeCUR) sobre células planctônicas e biofilme de cepa padrão de *C. albicans*; a segunda etapa analisou os efeitos da TFDa mediada por curcumina livre (CUR) sobre espécies de *Candida* e biofilmes provenientes de material coletado de pacientes com estomatite protética. As metodologias utilizadas nas 2 etapas do trabalho estão sumarizadas na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma das metodologias das duas etapas realizadas no trabalho



Fonte: elaborado pela autora.

## **4.1 Primeira etapa: efeitos da TDFa mediada por nanopartículas de ferro associadas a curcumina**

### **4.1.1 Microrganismos**

Para realização da primeira etapa do trabalho foi utilizada a cepa de referência de *C. albicans* SC5314. A cepa foi mantida em freezer a -80°C no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para ativação, a cepa foi cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Detroit, USA) por 24 h a 37°C.

### **4.1.2 Fotossensibilizador**

Nanopartículas de ferro revestidas por curcumina (NpFeCUR) foram utilizadas como fotossensibilizadores. As NpFeCUR foram sintetizadas pelo método de co-precipitação química e gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Anna Carolina Pinheiro Lage do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Minas).

### **4.1.3 Espectroscopia de absorção UV-Vis das NpFeCUR**

O espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) das NpFeCUR foi obtido para determinação da faixa de comprimento de onda e da fonte de luz utilizadas nos ensaios. Para esse teste, a solução estoque de NpFeCUR foi diluída em concentrações variando de 290 a 0,14 µg/mL, e então 100 µL de cada diluição foi colocada em placas de 96 poços específicas para leitura em UV (Corning, Nova York, EUA). Em seguida, a absorbância das diferentes diluições de

NpFeCUR foi mensurada em espectrofotômetro (Epoch, Biotek Instruments, Winoosk, EUA) na programação *Scanning absorption* para fazer a varredura em comprimentos de onda de 200 a 700 nm, com espaçamento de 10 nm.

#### 4.1.4 Fonte de Luz

A fonte de luz utilizada foi o fotopolimerizador Emitter G (Schuster, Santa Maria, RS) que possui emissores de luz (LED). Os seguintes parâmetros foram adotados: comprimento de onda de 420-480 nm (azul visível), potência de luz de 1250 mW/cm<sup>2</sup>, gerando uma densidade de energia de 131,5 J/cm<sup>2</sup> por 40 s (tempo de irradiação da TFDa) e totalizando uma densidade de potência de 3,28 W.

#### 4.1.5 Ensaio de susceptibilidade das NpFeCUR

A susceptibilidade da cepa de *C. albicans* SC5314 às NpFeCUR foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo de acordo com o Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST E. DEF. 7.3.2. 2020). NpFeCUR foram diluídas em água destilada estéril e uma solução estoque de fluconazol (FCZ, Sigma-Aldrich) foi preparada em DMSO (Sigma-Aldrich). Em seguida, as soluções-estoque foram diluídas de modo seriado em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich; com L-glutamina, pH 7,0, sem bicarbonato de sódio) e acrescido de 2% de glicose tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) 0,165 M, resultando em concentrações de 290 a 0,5 µg/mL. Em seguida, 100 µL de cada diluição foram adicionados aos poços de uma placa de microdiluição de 96 poços de fundo chato.

O inóculo fúngico foi preparado a partir da cultura de *C. albicans* SC5314 previamente crescida em ASD por 24 h à 37°C. Em seguida, uma alçada dessa cultura foi suspensa em água destilada estéril, agitada em vórtex por 15 segundos e quantificada em hemocitômetro. A concentração da suspensão fúngica foi ajustada

em  $5 \times 10^5$  células/mL e, em seguida, 100  $\mu$ L do inóculo fúngico ajustado foi adicionado aos poços da placa de microdiluição de 96 poços. Controle de crescimento contendo meio RPMI e inóculo fúngico, e controle de esterilidade contendo meio RPMI e água destilada estéril foram adicionados a placa. A levedura *Pichia kudriavzevii* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade do experimento. Após adição do inóculo fúngico, as placas foram incubadas por 24 h à 37°C. O ensaio foi realizado em duas placas, sendo uma placa para o grupo irradiado e outra não irradiada.

Os resultados foram analisados por leitura espectrométrica a 530 nm após o período de incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico para a NpFeCUR e 50% para FCZ, quando comparado ao controle de crescimento.

#### **4.1.6 TFDa em culturas planctônicas de *C. albicans* SC5314**

Determinada a susceptibilidade de células planctônicas de *C. albicans* SC5314 às NpFeCUR, a viabilidade fúngica após TFDa mediada por NpFeCUR foi quantificada. Os grupos experimentais foram divididos em grupo sem tratamento, sem luz e NpFeCUR (Np-L-), grupo tratado somente com luz (Np-L+), grupo tratado somente com NpFeCUR (Np+L-), e grupo tratado com NpFeCUR e luz (Np+L+).

##### **4.1.6.1 Preparo da suspensão de *C. albicans* SC5314**

A cepa *C. albicans* SC5314 cepa foi cultivada em ASD por 24 h a 37°C. Após esse período, uma alçada dessa cultura foi suspensa em solução salina, quantificada em hemocítmetro e padronizada a concentração de  $10^7$  células/mL (De Lapena et al., 2022, com modificações).

#### **4.1.6.2 Fotossensibilização das culturas planctônicas de *C. albicans* SC5314**

A fotossensibilização das culturas planctônicas de *C. albicans* foi realizada em placas de microdiluição de 96 poços. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de *C. albicans* SC5314 previamente padronizada em  $10^7$  células/mL foi adicionada em cada poço da placa. Em seguida, NpFeCUR (290 e 145 µg/mL) ou meio RPMI foi adicionado de acordo com os grupos experimentais descritos. As placas foram envolvidas com papel alumínio para evitar a irradiação de luz do ambiente e levadas para o agitador orbital (Solab Piracicaba, Brasil) no tempo de pré-irradiação de 5 min. Posteriormente, as placas foram irradiadas nos parâmetros descritos no item 4.1.4 (De Lapena et al., 2022, com modificações).

#### **4.1.6.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)**

Após a irradiação, diluições seriadas do conteúdo dos poços foram preparadas e 10 µL de cada diluição foram semeados 4 vezes em pontos diferentes de uma placa contendo ASD por meio da técnica da gota. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para determinação da viabilidade fúngica.

#### **4.1.7 TFDa em biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314**

Determinada a susceptibilidade de *C. albicans* SC5314 as NpFeCUR, a atividade da NpFeCUR como fotossensibilizador na TFDa contra biofilme monoespécie de *C. albicans* foi avaliada. Os grupos experimentais para avaliação da atividade da TFDa contra biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314 foram divididos em grupo sem tratamento, sem luz e NpFeCUR (Np-L-), grupo tratado somente com luz (Np-L+), grupo tratado somente com NpFeCUR (Np+ L-), e grupo tratado com NpFeCUR e luz (Np+L+).

#### 4.1.7.1 Formação do biofilme de *C. albicans* SC5314

O biofilme foi formado em fundo de placas de 96 poços. Para isso, a cepa de *C. albicans* SC5314 foi cultivada em ASD por 24 h a 37°C. A seguir, uma alçada da cultura foi removida, semeada em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB, Himedia, Mumbai, Índia) acrescido de 100 µM de glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e incubada a 37°C por 24 h. O crescimento foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). Esse procedimento foi repetido duas vezes. A contagem do número de células em suspensão foi determinada em hemocítômetro (De Lapena et al., 2022, com modificações).

Em seguida, foi adicionado uma alíquota de 200 µL da suspensão de *Candida* padronizada em 10<sup>7</sup> células/mL em cada poço. As placas foram incubadas por 1 h e 30 min em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm (Quimis, Diadema, SP, Brasil) para aderência inicial. Após esse período, as placas foram lavadas duas vezes com solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), e em seguida, adicionado 200 µL de caldo YNB. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h (De Lapena et al., 2022, com modificações).

#### 4.1.7.2 Fotossensibilização do biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314

Após as 24 h de formação do biofilme no fundo dos poços, o caldo foi aspirado e os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). Então, foi adicionado 200 µL de RPMI ou NpFeCUR, de acordo com cada grupo experimental. As placas foram envolvidas em papel alumínio para evitar a irradiação da luz do ambiente e colocadas em agitador orbital por 5 min (tempo de pré-irradiação). Posteriormente, as placas foram irradiadas nos parâmetros descritos no item 4.1.4 (De Lapena et al., 2022, com modificações).

#### **4.1.7.3 Contagem de células viáveis (UFC/mL)**

Após a irradiação, diluições seriadas do conteúdo dos poços foram preparadas e 10 µL de cada diluição foi semeado 4 vezes em pontos diferentes de uma placa contendo ASD por meio da técnica da gota. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para determinação da viabilidade fúngica.

#### **4.1.8 Síntese de outras nanopartículas (NpFePEI e NpFeCUR enriquecidas com curcumina) e testes em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans* SC5314**

Como os resultados obtidos com as NpFeCUR não foram positivos, duas estratégias de síntese das nanopartículas de ferro foram acrescentadas ao estudo. A primeira estratégia empregou polietilenoimina (NpFePEI) como agente redutor a fim de alterar a carga final das nanopartículas. A segunda abordagem consistiu no enriquecimento das NpFeCUR com curcumina livre após a síntese tradicional (NpFeCUR+).

As NpFePEI foram sintetizadas pelo método de co-precipitação química. As NpFeCUR+ foram preparadas utilizando a via de coprecipitação de ferrofluido. Após a síntese tradicional das NpFeCUR, a dispersão coloidal foi mantida com uma solução etanólica de CUR (1,6 g/L) a um pH 5,5, sob agitação magnética a 40°C durante 12 h. A solução coloidal final foi designada por NpFeCUR+ (De Santana et al., 2020).

Assim, os efeitos de NpFePEI e NpFeCUR+ sobre células planctônicas e biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314 foram avaliados conforme descrito nos itens 4.1.6 e 4.1.7. Para a fotossensibilização, o tempo de irradiação foi elevado para 80 s e 120 s.

## **4.2 Segunda etapa: TFDa mediada por curcumina (CUR) sobre cepas de *Candida* e biofilmes provenientes de estomatite protética**

### **4.2.1 Fotossensibilizador**

O fotossensibilizador utilizado foi a curcumina livre (CUR; Sigma-Aldrich). A CUR obtida em pó foi solubilizada em DMSO para obtenção de uma solução estoque na concentração de 5000 µg/mL.

### **4.2.2 Fonte de Luz**

A fonte de luz utilizada foi o fotopolimerizador Emitter G (Schuster, Santa Maria, RS) que possui emissores de luz (LED), utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 420-480 nm (azul visível), potência de luz de 1250 mW/cm<sup>2</sup>, gerando uma densidade de energia de 131,5 J/cm<sup>2</sup> por 40 s (tempo de irradiação da TFDa) e totalizando uma densidade de potência de 3,28 W.

### **4.2.3 Comitê de ética**

Este trabalho foi previamente submetido ao Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos (CEPh) do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP do campus de São José dos Campos. O protocolo experimental foi aprovado pelo CEPh do ICT/Unesp sob o número 5.827755 (ANEXO A). Após aprovação, foi realizada a coleta de amostras clínicas das lesões de estomatite protética de pacientes.

#### 4.2.4 População de estudo

Participaram do estudo 5 voluntários diagnosticados com quadro de estomatite protética associada à presença de prótese total ou parcial. As coletas foram realizadas em uma Unidade Básica de Saúde localizada na cidade de São José dos Campos, SP. Os critérios de inclusão foram indivíduos portadores de prótese total ou prótese parcial removível, não havendo dependência de idade, condição socioeconômica, etnia ou sexo. Os critérios de exclusão foram pacientes que fizeram uso de antibióticos, antifúngicos ou corticóides nos últimos 60 dias. Os participantes dispostos a participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

#### 4.2.5 Coleta e caracterização das amostras

A coleta das amostras foi realizada com o auxílio de escovas cervicais (Kolplast ci Ltda – Itupeva, SP, Brasil) por meio de fricção da lesão do palato. Além da coleta na região do palato, foram coletadas amostras da prótese dentária. Um *pool* das amostras de palato e prótese de cada paciente foi formado e as amostras coletadas foram armazenadas em tubos cônicos contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI; Difco) estéril e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT/UNESP em no máximo 3 h após a coleta.

A seguir, a presença de leveduras características de *Candida* nas amostras coletadas foi confirmada por meio da observação de campos microscópicos distintos do esfregaço corado pelo método de Gram (em aumento de 1.000x). As amostras também foram semeadas em ASD com cloranfenicol e meio seletivo cromogênico (Chromagar *Candida*; Difco) para identificação presuntiva de leveduras do gênero *Candida* e espécies relacionadas. Após a confirmação da presença de células e colônias sugestivas de *Candida* spp., as amostras foram congeladas em freezer -80 °C.

#### 4.2.6 Identificação das amostras por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF)

As amostras foram descongeladas e semeadas em placas de ASD. As colônias foram isoladas por meio do método da técnica de esgotamento em estrias, sendo posteriormente utilizadas para identificação por meio da espectrometria de massa (MALDI-TOF).

O MALDI-TOF diagnostica as proteínas de um determinado microrganismo. Para tanto, as amostras foram colocadas em uma matriz (lâmina especial) com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Após incidência de um feixe de laser sobre a matriz, as partículas são ionizadas, separadas de acordo com sua relação massa-carga e medidas pelo tempo de chegada aos detectores. Com base nos valores de massa-carga, os espectros gerados são comparados com espectros de microrganismos conhecidos. Assim, por meio da carga molecular e do tamanho das proteínas ionizadas se estabelece um espectrograma de massa.

O ensaio foi realizado em parceria com a pesquisadora Karoline Kristina Kemmerich na Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). O ensaio foi feito usando o MALDI-TOF Biotyper Microflex LT/SH (Bruker, Massachusetts, EUA). Para identificação das amostras, cada lista de picos gerada foi comparada diretamente com a lista de picos dos espectros de referência, denominados MSP (*Main Spectra Projections*), presentes na biblioteca IVD (*In Vitro Diagnostic System*, Bruker Daltonics) integrada, por meio do algoritmo Biotyper.

No processamento, realiza-se a correspondência de padrões de picos, utilizando a posição, as distribuições de intensidade e a frequência de picos, atribuindo-se os escores de classificação sem qualquer intervenção do utilizador. As análises por Biotyper são classificadas utilizando os valores de escore propostos pelo fabricante: uma pontuação entre 2,300 e 3,000 indica a identificação confiável de espécie, uma pontuação entre 2,000 e 2,299 indica a identificação confiável de gênero e provável identificação de espécie, uma pontuação entre 1,700 e 1,999 indica provável identificação de gênero, e uma pontuação abaixo de 1,700 indica que não há identificação confiável (Abdolrasouli et al., 2022).

#### **4.2.7 Ensaio de susceptibilidade das cepas de *Candida* isoladas à CUR**

A susceptibilidade das cepas de *Candida* spp. à CUR foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo de acordo com EUCAST E. DEF. 7.3.2. 2020. A solução estoque de CUR foi diluída em RPMI 1640. O ensaio foi realizado nas condições descritas no item 4.1.5. Concentrações de CUR variando de 64 a 0,125 µg/mL foram testadas. O antifúngico FCZ e *P. kudriavzevii* ATCC 6258 foram utilizados como controle de qualidade. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico para a CUR.

#### **4.2.8 Aplicação da TFDa em culturas planctônicas das cepas de *Candida* isoladas de estomatite protética**

Estabelecida a CIM da CUR para as amostras de *Candida* spp., a viabilidade fúngica frente ao tratamento com CUR foi avaliada pela determinação da curva de morte em diferentes tempos (Urquhart et al., 2023, com modificações). O inóculo fúngico foi preparado a partir da cultura das amostras isoladas previamente crescidas em ASD por 24 h à 37°C. O inóculo fúngico foi suspenso em água destilada estéril, quantificado em hemocitômetro e ajustado. Então, o inóculo fúngico ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) foi adicionado em meio RPMI com 2% de glicose e tratado com CUR em sua respectiva CIM (C+L-) e CUR em sua respectiva CIM na presença de luz (C+L+). Um grupo controle sem tratamento foi incluído no ensaio. Alíquotas foram retiradas após 2, 8, e 24 h, plaqueadas em ASD, e incubadas por 24 h a 37°C. Em seguida, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de cada grupo experimental foi determinado.

#### **4.2.9 TFDa sobre biofilmes monoespécies das cepas de *Candida* isoladas de estomatite protética**

A partir das cepas de *Candida* isoladas e identificadas, os biofilmes foram preparados conforme descrito no item 4.1.7.1.

Para realização da fotossensibilização, CUR foi utilizada como fotossensibilizador. Os grupos experimentais para avaliação da atividade da TFDa em biofilme monoespécie das cepas de *Candida* das amostras foram divididos em grupo sem tratamento, sem luz e CUR, (C-L-), grupos tratados somente com luz, (C-L+), grupos tratados somente com CUR, (C+L-) e grupo tratado com CUR e luz (C+L+).

Após as 24 h de incubação do biofilme monoespécie, CUR a 1x, 5x, 10x, 20x CIM ou meio YNB foi adicionado de acordo com os grupos experimentais. As placas foram envolvidas com papel alumínio para evitar a irradiação de luz do ambiente e levadas para o agitador orbital no tempo de pré-irradiação de 5 min. Posteriormente, as placas foram irradiadas com Emitter G utilizando os parâmetros descritos no item 4.1.4.

Após a irradiação, diluições seriadas do conteúdo dos poços foram preparadas e 10 µL de cada diluição foi semeado 4 vezes em pontos diferentes de uma placa contendo ASD por meio da técnica da gota. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para determinação da viabilidade fúngica.

#### **4.2.10 TFDa sobre biofilmes microcosmos formados a partir da amostra de estomatite protética**

##### **4.2.10.1 Confecção dos corpos de prova**

Para a formação dos biofilmes microcosmos, foram utilizados corpos de prova confeccionados conforme metodologia descrita por Garcia et al. (2021), com modificações. Para tanto, utilizou-se resina acrílica termopolimerizável à base de polimetilmetacrilato (Vipi Cril Plus, VIPI, Pirassununga, Brasil), material rotineiramente empregado na confecção de próteses dentárias. Ao final, foram confeccionados corpos de prova medindo 5 mm de diâmetro e 2,5 mm de

espessura.

#### **4.2.10.2 Formação do biofilme microcosmo**

As amostras obtidas dos pacientes com estomatite protética foram descongeladas e homogeneizadas. Então, 400 µL foi adicionado em 20 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose e incubado a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 10 mL de caldo BHI fresco enriquecido com 5% de sacarose.

Em seguida, os corpos de prova previamente autoclavados foram posicionados no fundo dos poços das placas de 24 poços com auxílio de uma pinça estéril. Com os corpos de prova devidamente posicionados, foi acrescentado a cada poço 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose e 225 µL do inóculo previamente crescido. As placas foram incubadas a 37 °C por 96 h a 5% de CO<sub>2</sub>, de modo que os poços foram lavados e 2 mL de caldo BHI com 5% de sacarose fresco foi adicionado a cada 24 h (Garcia et al., 2021).

#### **4.2.10.3 Fotossensibilização do biofilme microcosmo mediada por CUR**

Os grupos experimentais para avaliação da atividade da TFDa em biofilme microcosmos foram divididos em grupo sem tratamento, sem luz e CUR (C-L-), grupo tratado somente com luz (C-L+), grupo tratado somente com CUR (C+L-) e grupo tratado com CUR e luz (C+L+).

Após a formação do biofilme, os corpos de prova foram posicionados na intersecção dos poços da placa de 24 poços e 400 µL de CUR (20 µg/mL) ou caldo BHI foi adicionado conforme os grupos experimentais. As placas foram protegidas da luz e mantidas a temperatura ambiente por um tempo de pré-irradiação de 5 min. Em seguida, os grupos experimentais que receberam luz foram irradiados com o

dispositivo Emitter G utilizando os parâmetros descritos no item 4.1.4.

#### **4.2.10.4 Contagem de células viáveis (UFC/mL)**

Após a fotossensibilização, os corpos de prova foram transferidos para tubos Falcon contendo 4 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) e os biofilmes aderidos foram desprendidos utilizando homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD2200, Bandelin Eletronic) com potência de 7 W por 30 s. A partir da solução obtida, diluições seriadas da suspensão do biofilme foram realizadas e alíquotas foram semeadas em placas contendo meios de cultura específicos: meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI, Difco), ágar Mitis Salivarius (MS; Difco) para contagem de estreptococos, ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS; Difco) para contagem de estreptococos do grupo *mutans*, ágar Manitol (Difco) para contagem de estafilococos e ASD com cloranfenicol para contagem de leveduras. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 h para determinação da viabilidade microbiana (UFC/mL).

### **4.3 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos na contagem de células viáveis (UFC/mL) foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Tukey por meio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para análise estatística, foram utilizados, no mínimo, quatro réplicas técnicas por grupo. Os ensaios foram repetidos, no mínimo, duas vezes. O nível de significância de 5% foi adotado em todas as análises.

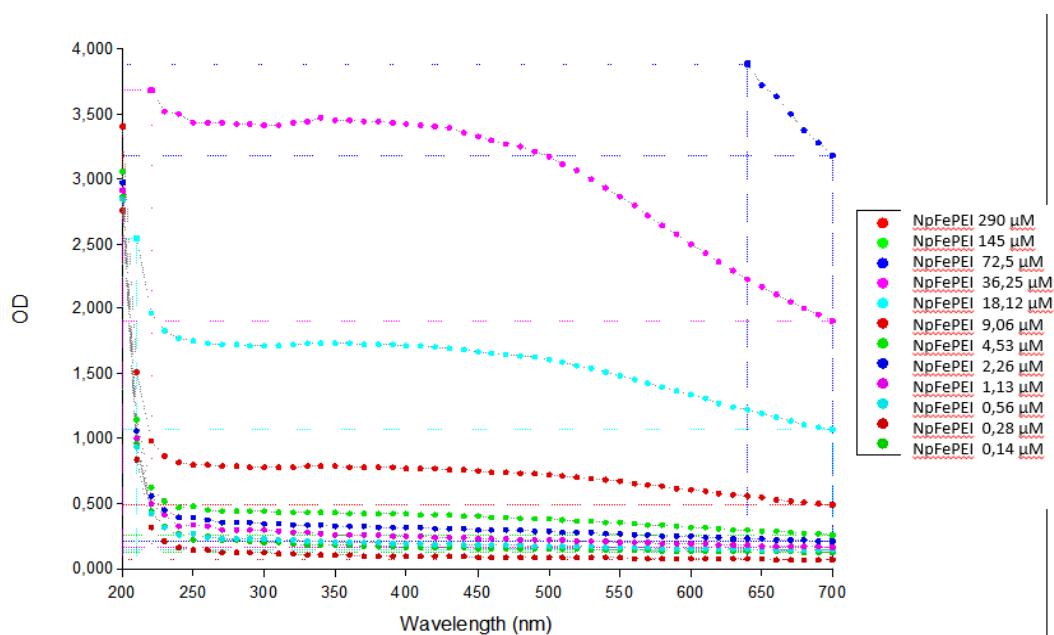
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Primeira etapa: estudo da TDFa mediada por nanopartículas de ferro associadas a curcumina

#### 5.1.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis das NpFeCUR

O espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) das NpFeCUR foi realizado para determinação da faixa de comprimento de onda de ação das NpFeCUR. Na espectroscopia UV-Vis de NpFeCUR, não foi observado pico de absorção para determinação do comprimento de onda de ação das mesmas (Figura 2).

Figura 2 – Espectroscopia de absorção UV-Vis da NpFeCUR em concentrações variando de 0,14 a 290  $\mu\text{g/mL}$



Fonte: elaborado pela autora.

### **5.1.2 Susceptibilidade de *C. albicans* às NpFeCUR irradiadas e não irradiadas por LED**

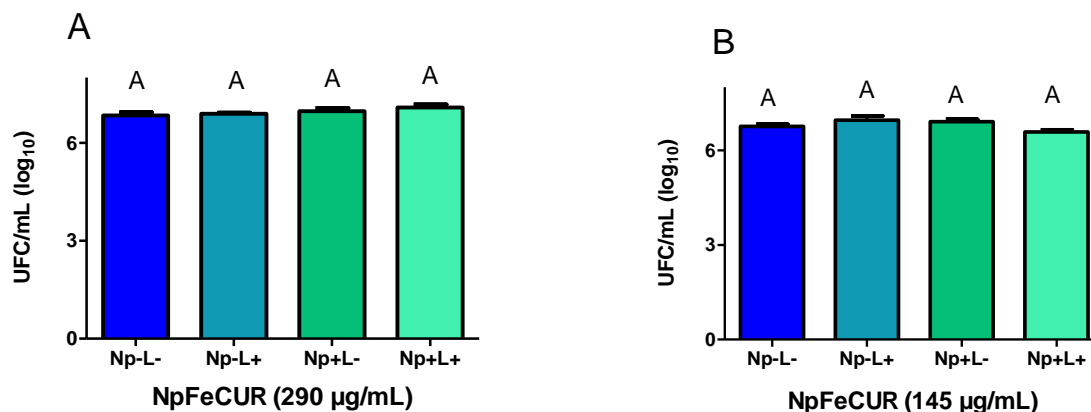
A atividade antimicrobiana das NpFeCUR foi determinada pela CIM. Não foram encontrados valores de CIM para placa não irradiada e irradiada para as NpFeCUR. O valor de CIM do FCZ foi de 0,25 µg/mL.

### **5.1.3 Viabilidade das células planctônicas de *C. albicans* SC5314 submetidas à TFDa mediada por NpFeCUR**

A viabilidade das células planctônicas de *C. albicans* foi avaliada na TFDa mediada por NpFeCUR em duas diferentes concentrações. Na concentração de 290 µg/mL, os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFeCUR na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFeCUR (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 3A).

Na concentração de 145 µg/mL, os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFeCUR na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFeCUR (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 3B).

Figura 3 – Efeito da TFDa mediada por nanopartículas de ferro associadas a curcumina (NpFeCUR) na viabilidade de células planctônicas de *C. albicans* SC5314



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub>UFC/mL) de células de *C. albicans* SC5314 não expostas (Np-) e expostas a nanopartícula de ferro associada a curcumina (Np+) na concentração de 290 µg/mL (A) e 145 µg/mL (B) na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

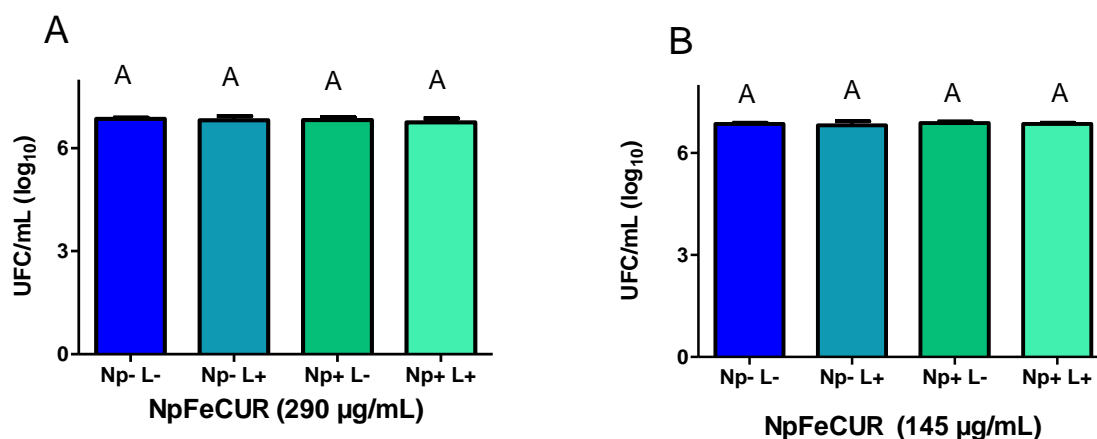
Fonte: elaborado pela autora.

#### 5.1.4 Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314 submetido a TFDa mediada por NpFeCUR

A viabilidade do biofilme monoespécie de *C. albicans* foi avaliada na TFDa mediada por NpFeCUR em duas diferentes concentrações. Na concentração de 290 µg/mL, os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFeCUR na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFeCUR (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 4A).

Na concentração de 145 µg/mL, os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 6,85 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFeCUR na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFeCUR (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 4B).

Figura 4 – Efeito da TFDa mediada por nanopartículas de ferro associadas a curcumina (NpFeCUR) na viabilidade de biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub>UFC/mL) de células de *C. albicans* SC5314 não expostas (Np-) e expostas a nanopartícula de ferro associada a curcumina (Np+) na concentração de 290 µg/mL (A) e 145 µg/mL (B) na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

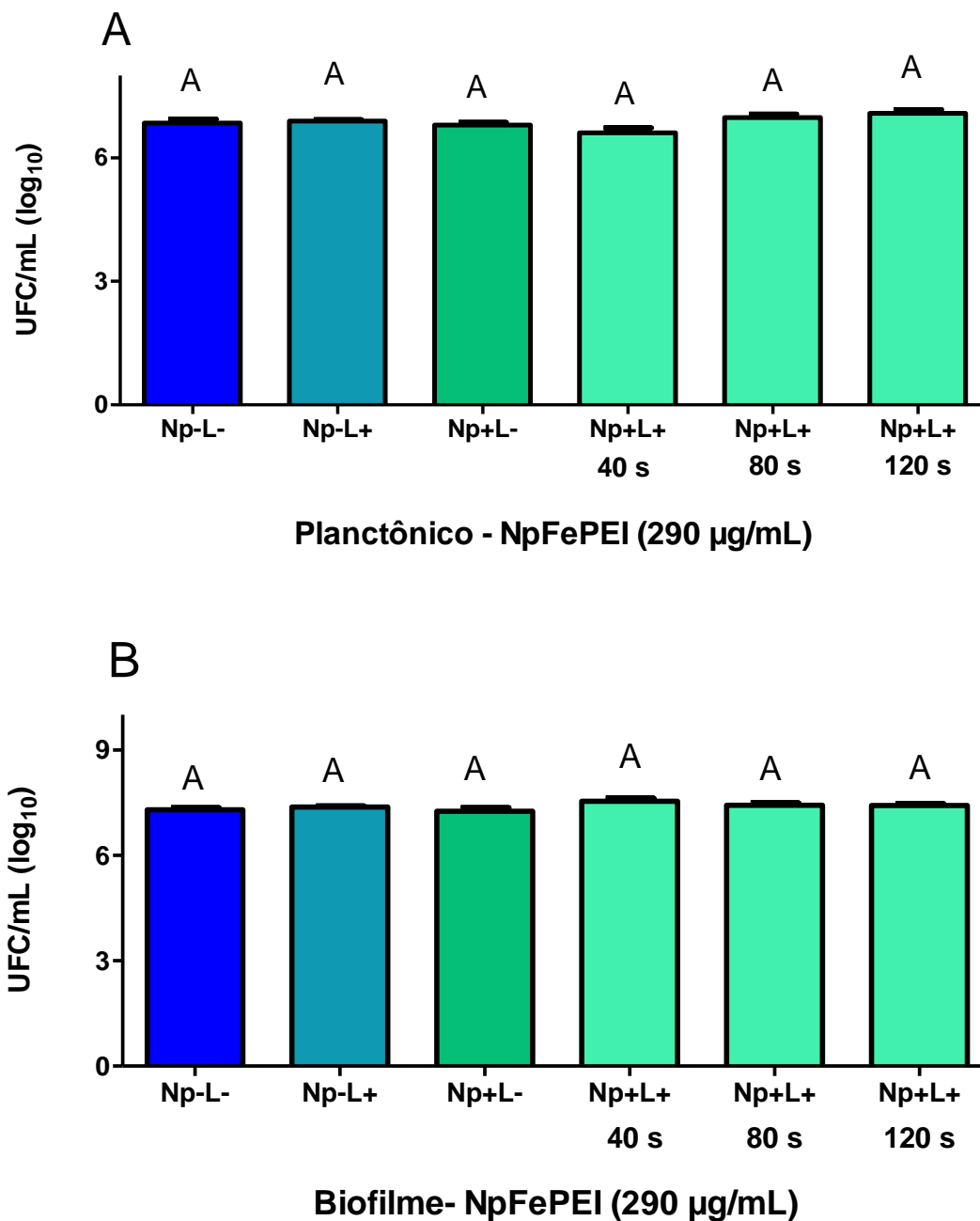
Fonte: elaborado pela autora.

### 5.1.5 Viabilidade das células planctônicas e do biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314 submetido a TFDa mediada por NpFePEI

A análise da viabilidade de células planctônicas de *C. albicans* submetidas a TFDa mediada por NpFePEI revelou que os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFePEI na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFePEI (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 5A).

Na análise da viabilidade do biofilme monoespécie, observou-se que os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 7,2 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFePEI na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFePEI (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 5B).

Figura 5 – Efeito da TFDa mediada por nanopartículas de ferro associadas a PEI (NpFePEI) na viabilidade das células planctônicas e do biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314



Legenda: Viabilidade ( $\log_{10}$ UFC/mL) de células planctônicas (A) e biofilme monoespécie (B) de *C. albicans* SC5314 não expostas (Np-) e expostas a nanopartícula de ferro associada a PEI (Np+) na concentração de 290  $\mu\text{g/mL}$  na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

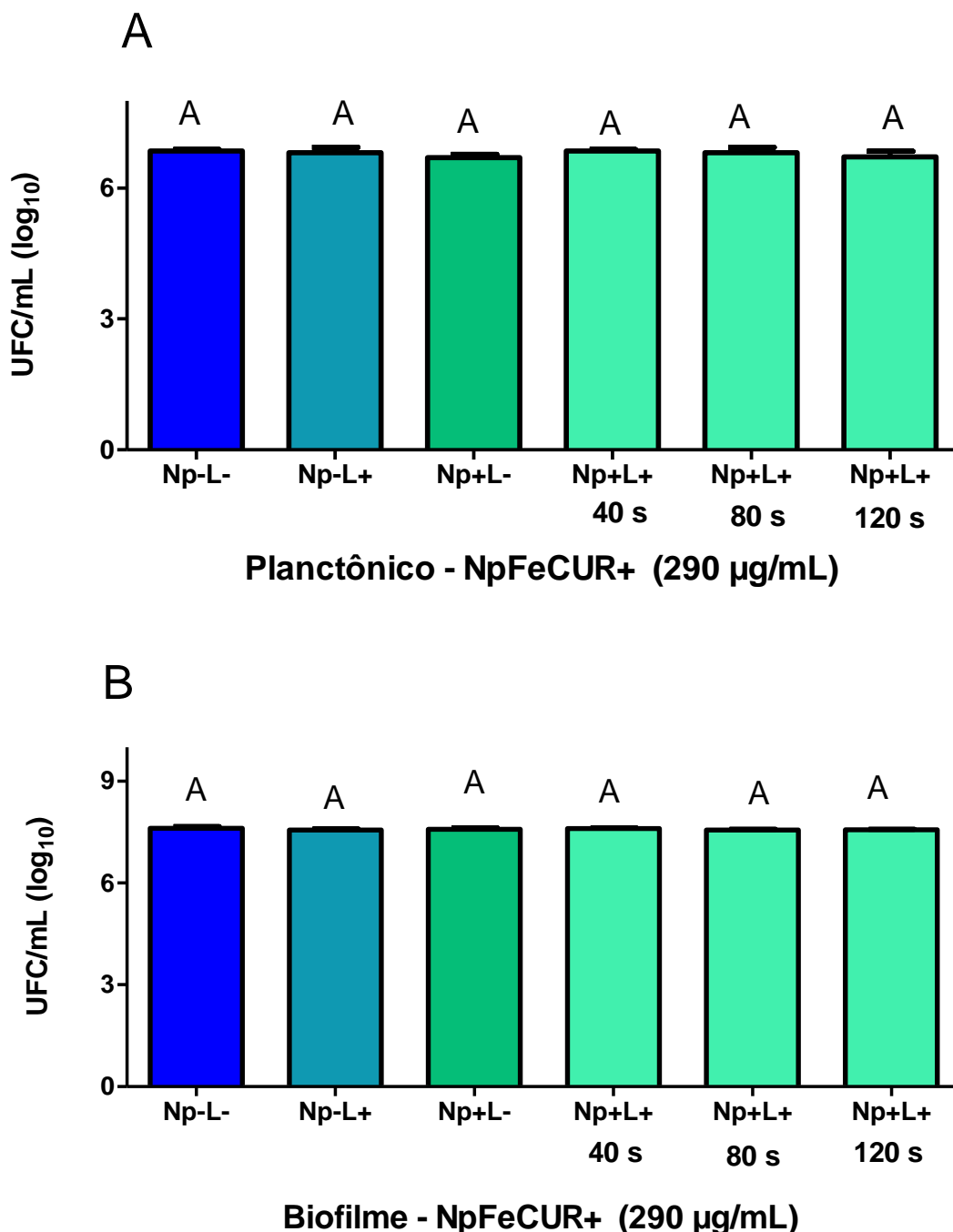
Fonte: elaborado pela autora.

### **5.1.6 Viabilidade das células planctônicas e do biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314 submetido a TFDa mediada por NpFeCUR+ enriquecidas com curcumina**

Na análise da viabilidade do biofilme monoespécie, observou-se que os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFePEI na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFePEI (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 6A).

A análise da viabilidade do biofilme monoespécie de *C. albicans* revelou que os grupos controles Np-L- e Np-L+ cresceram em média 7,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. A NpFePEI na ausência de luz não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L-. A TFDa mediada por NpFePEI (grupo Np+L+) também não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica quando comparado ao grupo Np-L- (Figura 6B).

Figura 6 – Efeito da TFDa mediada por nanopartículas de ferro enriquecidas com CUR (NpFeCUR+) na viabilidade das células planctônicas e do biofilme monoespécie de *C. albicans* SC5314



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub>UFC/mL) de células planctônicas (A) e biofilme monoespécie (B) de *C. albicans* SC5314 não expostas (Np-) e expostas a nanopartícula de ferro enriquecidas por CUR (Np+) na concentração de 290 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pela autora.

## 5.2 Segunda etapa: estudo da TFDa mediada por curcumina (CUR) sobre cepas de *Candida* e biofilmes provenientes de estomatite protética

### 5.2.1 Presença de *Candida* nas amostras clínicas de estomatite protética e identificação das espécies por MALDI-TOF

Entre as amostras clínicas coletadas dos 5 pacientes, apenas 3 (P1, P2 e P3) apresentaram leveduras na análise microscópica e crescimento em meios de cultura, com características sugestivas de *Candida*.

Os resultados da análise por MALDI-TOF estão expressos na Tabela 1. É possível observar que os isolados das amostras P1 e P3 corresponderam a espécie *Candida dubliniensis* com escores de 2.122 e 2.202, respectivamente; enquanto o da amostra P2 correspondeu à *Candida albicans* com escore de 2.497.

Tabela 1 – Identificação por MALDI-TOF dos isolados de *Candida* obtido a partir das amostras dos pacientes com estomatite protética

Isolado	Organismo (melhor combinação)	Score
P1	<i>C. dubliniensis</i>	2.122
P2	<i>C. albicans</i>	2.497
P3	<i>C. dubliniensis</i>	2.205

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.2 Ensaio de susceptibilidade das espécies de *Candida* à CUR

Os valores de CIM de CUR contra as cepas de *Candida* isoladas estão expressos na Tabela 2. Os valores de CIM da placa não irradiada (NR) foram de 64 µg/mL de CUR para as amostras 1, 2 e 3. A CIM de FCZ foi de 0,25 µg/mL para amostra 1 e 2, e 0,12 µg/mL para amostra 3. Na placa irradiada (IR), a CIM foi de 4 µg/mL para CUR para as amostras 1, 2 e 3. A irradiação da placa resultou em uma

redução de 16 vezes no valor de CIM para CUR.

Tabela 2 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM; µg/mL) de curcumina (CUR) e fluconazol (FCZ) de placas não irradiada (NR) e irradiada (IR) para cepas de *Candida* isoladas de estomatite protética

Cepas	CIM (µg/mL)		
	NR	IR	FCZ
<i>C. dubliniensis</i> (P1)	64	4 (16X)	0,25
<i>C. albicans</i> (P2)	64	4 (16X)	0,25
<i>C. dubliniensis</i> (P3)	64	4 (16X)	0,12

Legenda: CIM: concentração inibitória mínima; CUR: curcumina; FCZ: fluconazol; NR: não irradiado, IR: irradiado. Os valores entre parênteses representam a redução da CIM de CUR na placa irradiada em relação a placa não irradiada.

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.3 Aplicação da TFDa em culturas planctônicas das cepas de *Candida* isoladas de estomatite protética

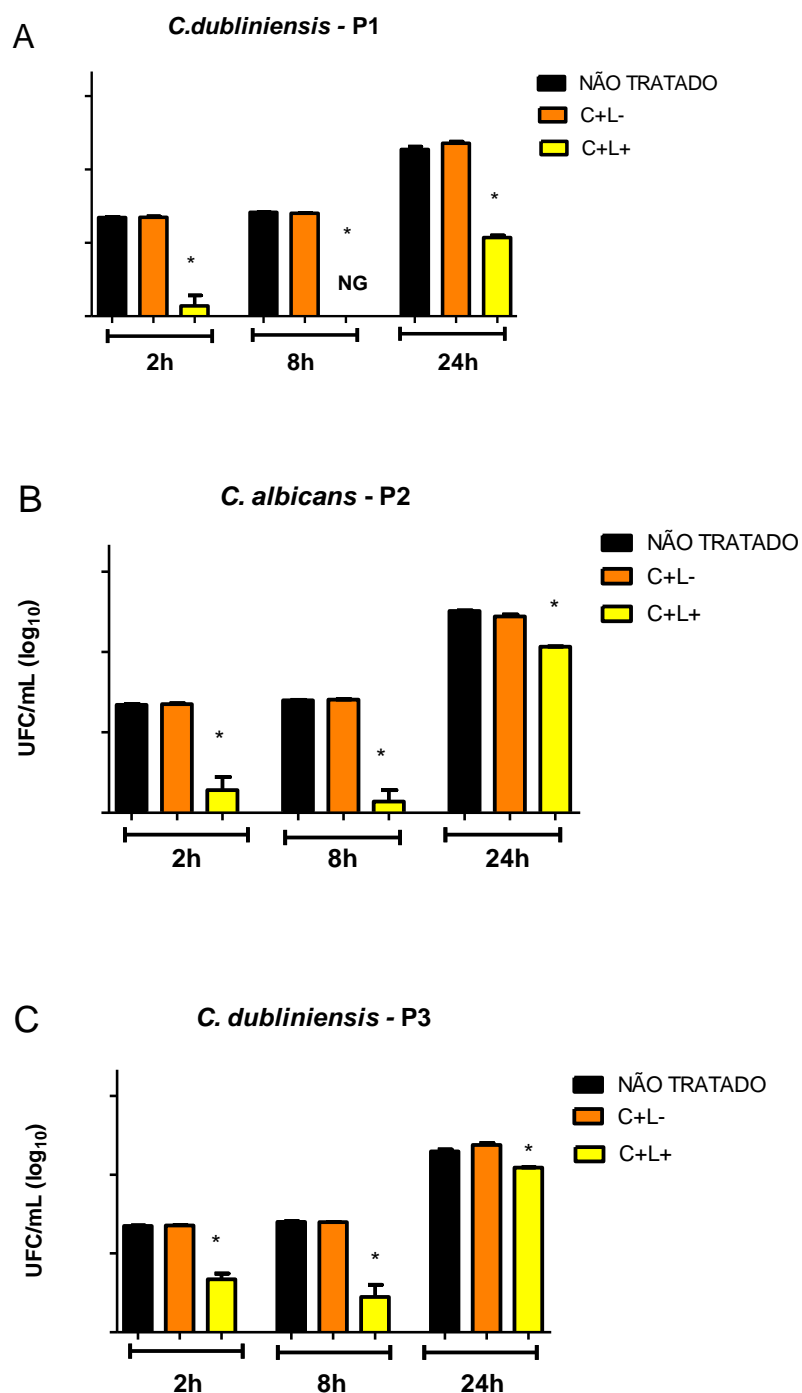
A análise da aplicação da TFDa em culturas planctônicas para *C. dubliniensis* do paciente P1 revelou que o tratamento com CUR na ausência de luz (C+L-) não foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica. Entretanto, na presença de luz e CUR (C+L+), reduções significativas foram observadas de 3,6 log<sub>10</sub>UFC/mL para 2 h, 4,2 log<sub>10</sub>UFC/mL para 8 h e 3,6 log<sub>10</sub>UFC/mL para 24 h quando comparada aos grupos C-L- e C+L- (Figura 7A).

Para *C. albicans* do paciente P2, houve redução de crescimento entre o grupo controle e o grupo tratado com TFDa de 3,2 log<sub>10</sub>UFC/mL para 2 h, 3,8 log<sub>10</sub>UFC/mL para 8 h e 1,4 log<sub>10</sub>UFC/mL para 24 h. (Figura 7B)

A análise da aplicação da TFDa em culturas planctônicas para *C. dubliniensis* do paciente P3, mostrou que houve redução de crescimento da cepa para o grupo tratado com TFDa em relação ao grupo controle, sendo de 2

$\log_{10}$ UFC/mL para 2 h, 2,9  $\log_{10}$ UFC/mL para 8 h e 0,6  $\log_{10}$ UFC/mL para 24 h (Figura 7C).

Figura 7 - Viabilidade ( $\log_{10}$  UFC/mL) de células de *C. dubliniensis* dos pacientes P1 e P3 e *C. albicans* do paciente P2 frente as concentrações de CIM ao longo do tempo



Legenda: NG: sem crescimento; (\*) representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo tratado com a TFDa e os grupos não tratados.

Fonte: elaborado pela autora.

## 5.2.4 Viabilidade dos biofilmes monoespécies das cepas de *Candida* isoladas das amostras clínicas e submetidos à TFDa mediada por CUR

### 5.2.4.1 Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* P1 submetido a TFDa mediada por CUR

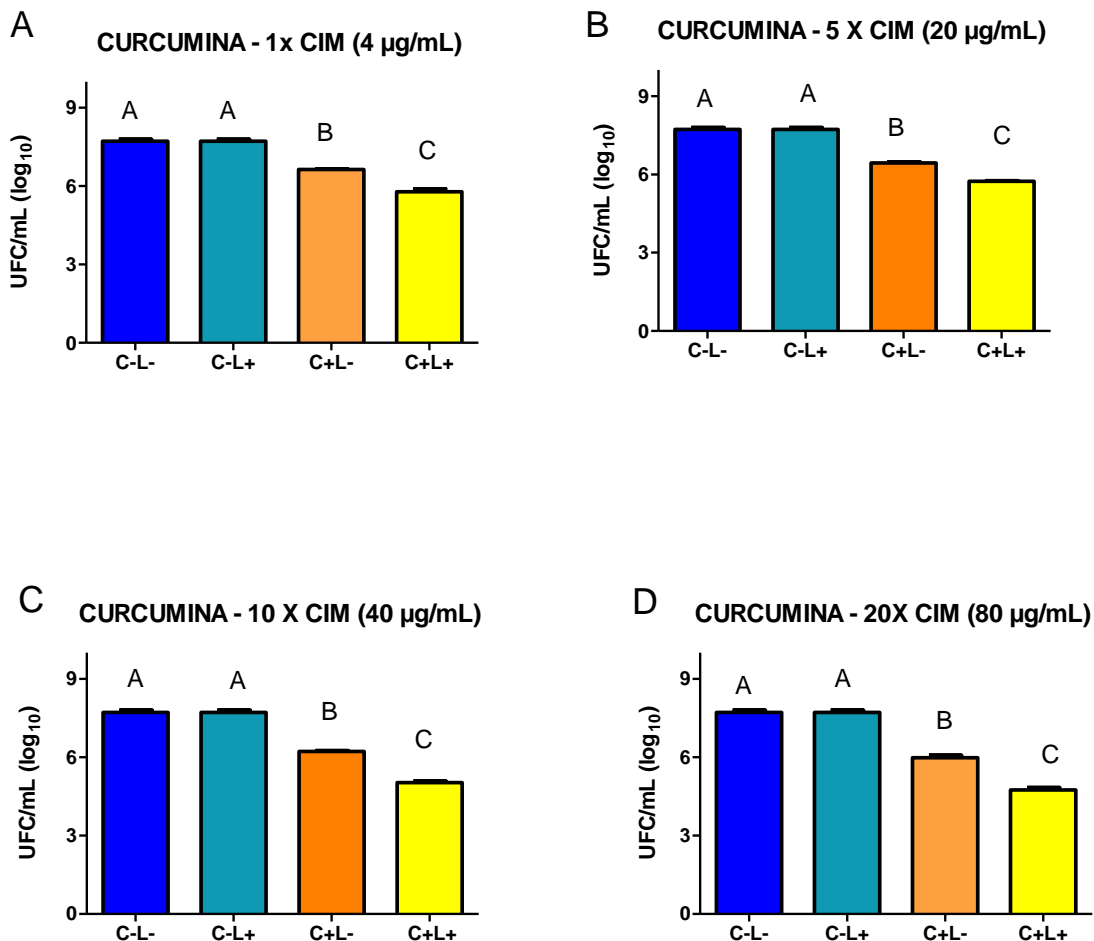
Na concentração de 4 µg/mL (1x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,7 log<sub>10</sub> UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 1,1 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 2,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 8A).

Na concentração de 20 µg/mL (5x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,7 log<sub>10</sub> UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 2,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 8B).

Na concentração de 40 µg/mL (10x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,7 log<sub>10</sub> UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 1,5 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 2,7 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 8C).

Na concentração de 80 µg/mL (20x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,7 log<sub>10</sub> UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 1,8 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 3,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 8D).

Figura 8 – Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* P1 submetido a TFDa mediada por CUR



Legenda: Viabilidade ( $\log_{10}$  UFC/mL) microbiana de biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* P1 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 1,5, 10 e 20 vezes o CIM na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pela autora.

#### 5.2.4.2 Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. albicans* P2 submetido a TFDa mediada por CUR

Na concentração de 4 µg/mL (1x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,8  $\log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 0,5  $\log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-.

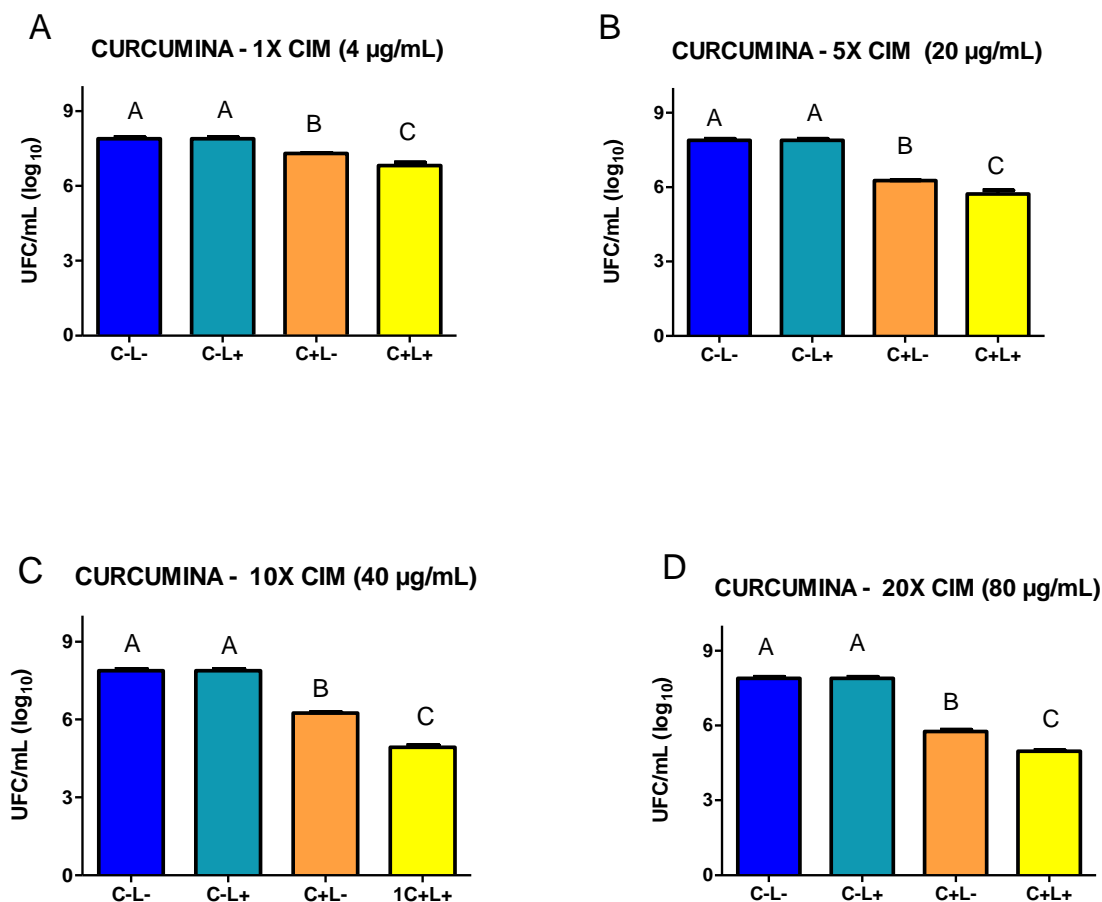
A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $1,0 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 9A).

Na concentração de  $20 \mu\text{g/mL}$  (5x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média  $7,8 \log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $1,6 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $2,1 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 9B).

Na concentração de  $40 \mu\text{g/mL}$  (10x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média  $7,8 \log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $1,6 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $2,9 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 9C).

Na concentração de  $80 \mu\text{g/mL}$  (20x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média  $7,7 \log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $2,1 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $2,9 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L- (Figura 9D).

Figura 9 - Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. albicans* P2 submetido a TFDA mediada por CUR



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub> UFC/mL) microbiana de biofilme monoespécie de *C. albicans* P2 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 1,5, 10 e 20 vezes o CIM na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pela autora.

#### 5.2.4.3 Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* P3 submetido a TFDA mediada por CUR

Na concentração de 4 µg/mL (1x CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média 7,9 log<sub>10</sub> UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em 1,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDA mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica

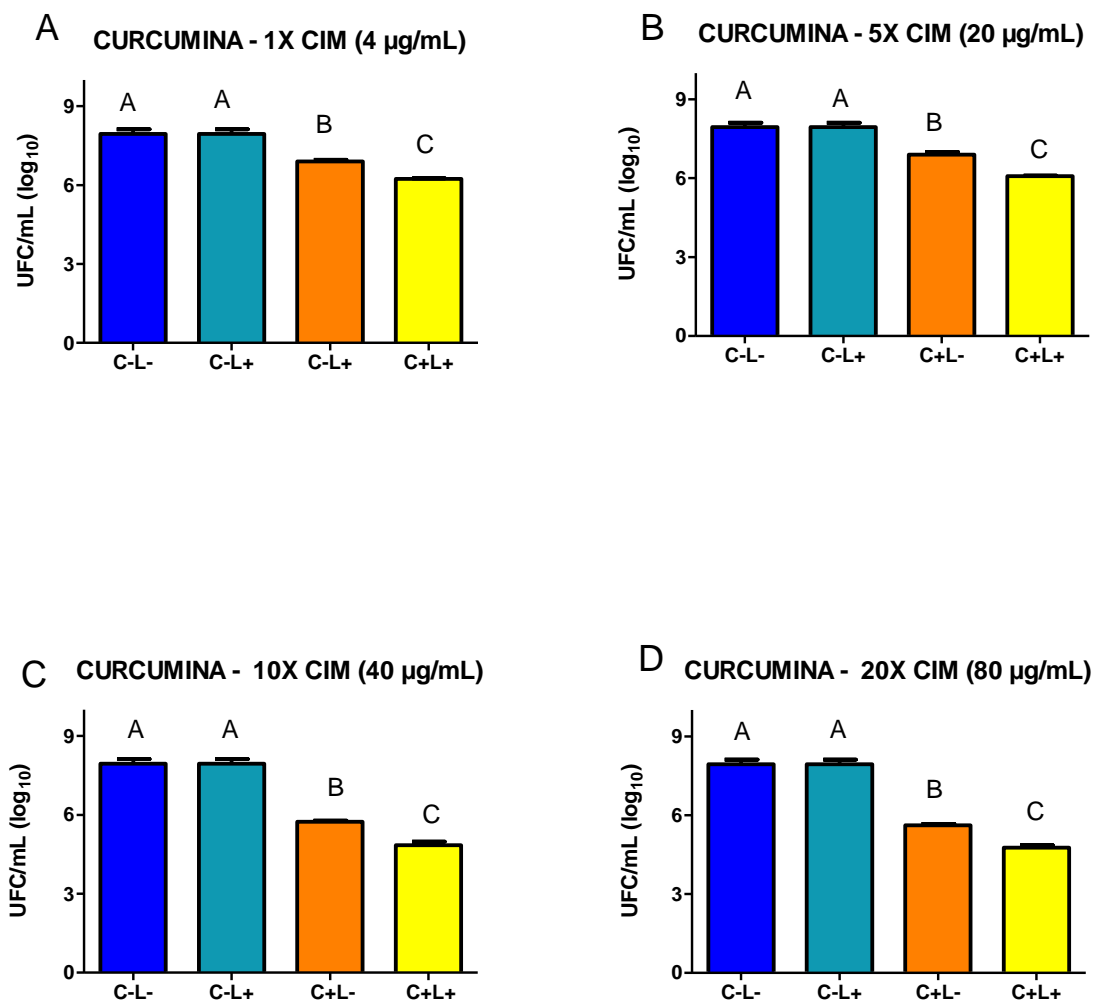
em  $1,7 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. (Figura 10A).

Na concentração de  $20 \mu\text{g/mL}$  ( $5x$  CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média  $7,9 \log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $1,0 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $1,9 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. (Figura 10B).

Na concentração de  $40 \mu\text{g/mL}$  ( $10x$  CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média  $7,9 \log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $2,2 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $3,1 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. (Figura 10C).

Na concentração de  $80 \mu\text{g/mL}$  ( $20x$  CIM), os grupos controles C-L- e C-L+ cresceram em média  $7,9 \log_{10}$  UFC/mL. A CUR na ausência de luz foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $2,3 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. A TFDa mediada por CUR (grupo C+L+) foi capaz de reduzir a viabilidade fúngica em  $3,2 \log_{10}$  UFC/mL quando comparado ao grupo C-L-. (Figura 10D).

Figura 10 - Viabilidade do biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* P3 submetido a TFDa mediada por CUR



Legenda: Viabilidade (log<sup>10</sup> UFC/mL) microbiana de biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* P3 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 1,5, 10 e 20 vezes o CIM na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pela autora.

## 5.2.5 Viabilidade microbiana dos biofilmes microcosmos de estomatite protética submetidos a TFDa mediada por CUR

### 5.2.5.1 Viabilidade microbiana do biofilme microcosmo formado a partir da amostra clínica do paciente 1

A amostra P1 submetida a TFDa com CUR (20 µg/mL, 5x CIM) apresentou crescimento microbiano nos meios ágar BHI, MS, MSBS, Manitol e ASD com cloranfenicol. Na contagem de microrganismos em meio não seletivo (ágar BHI), o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,2 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa (C+L+) apresentou uma redução de 2,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 11A).

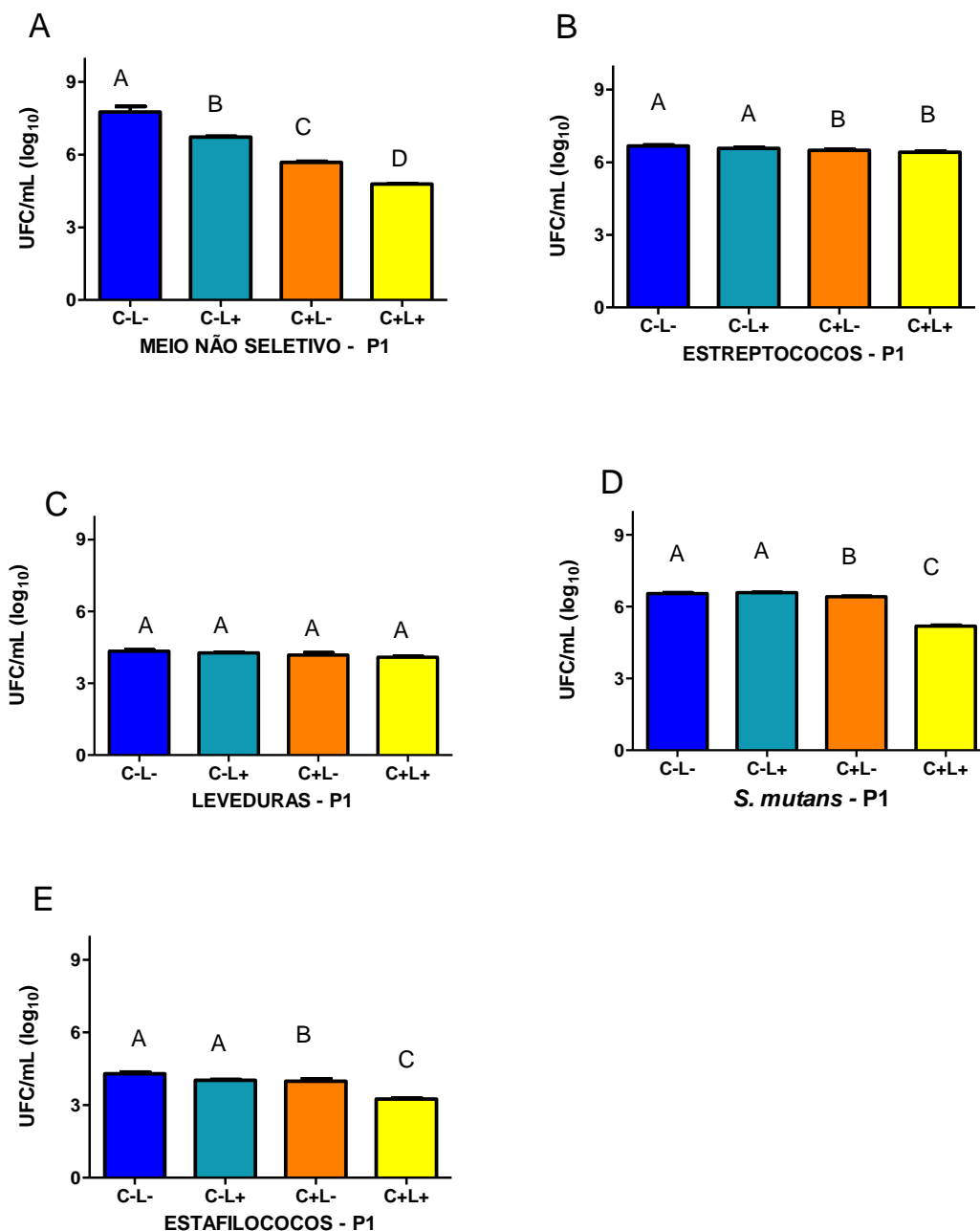
Na contagem dos estreptococos em MS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e ao grupo C+L- (Figura 11B).

Na contagem de leveduras em ASD com cloranfenicol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 4,2 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e ao grupo C+L- (Figura 11C).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,4 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 1,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 11D).

Na contagem de estafilococos em ágar Manitol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 4,1 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 0,9 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,7 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 11E).

Figura 11 – Viabilidade microbiana de biofilme microcosmos da amostra P1 submetido a TFDa mediada por CUR (20 µg/mL)



Legenda: Viabilidade (log<sup>10</sup> UFC/mL) microbiana de biofilme microcosmo da amostra P1 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 20 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Contagem A) em meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI), (B) de estreptococos (ágar Mitis Salivarius, MS), (C) de leveduras [ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol], (D) de estreptococos do grupo *mutans* (ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose, MSBS), (E) de estafilococos (ágar Manitol). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Fonte: elaborado pela autora.

A amostra 1 submetida a TFDa com CUR (40 µg/mL, 10x CIM) apresentou crescimento microbiano nos meios ágar BHI, MS, MSBS, Manitol e ASD com cloranfenicol. Na contagem de microrganismos em meio não seletivo (ágar BHI), o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,9 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa (C+L+) apresentou uma redução de 2,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 12A).

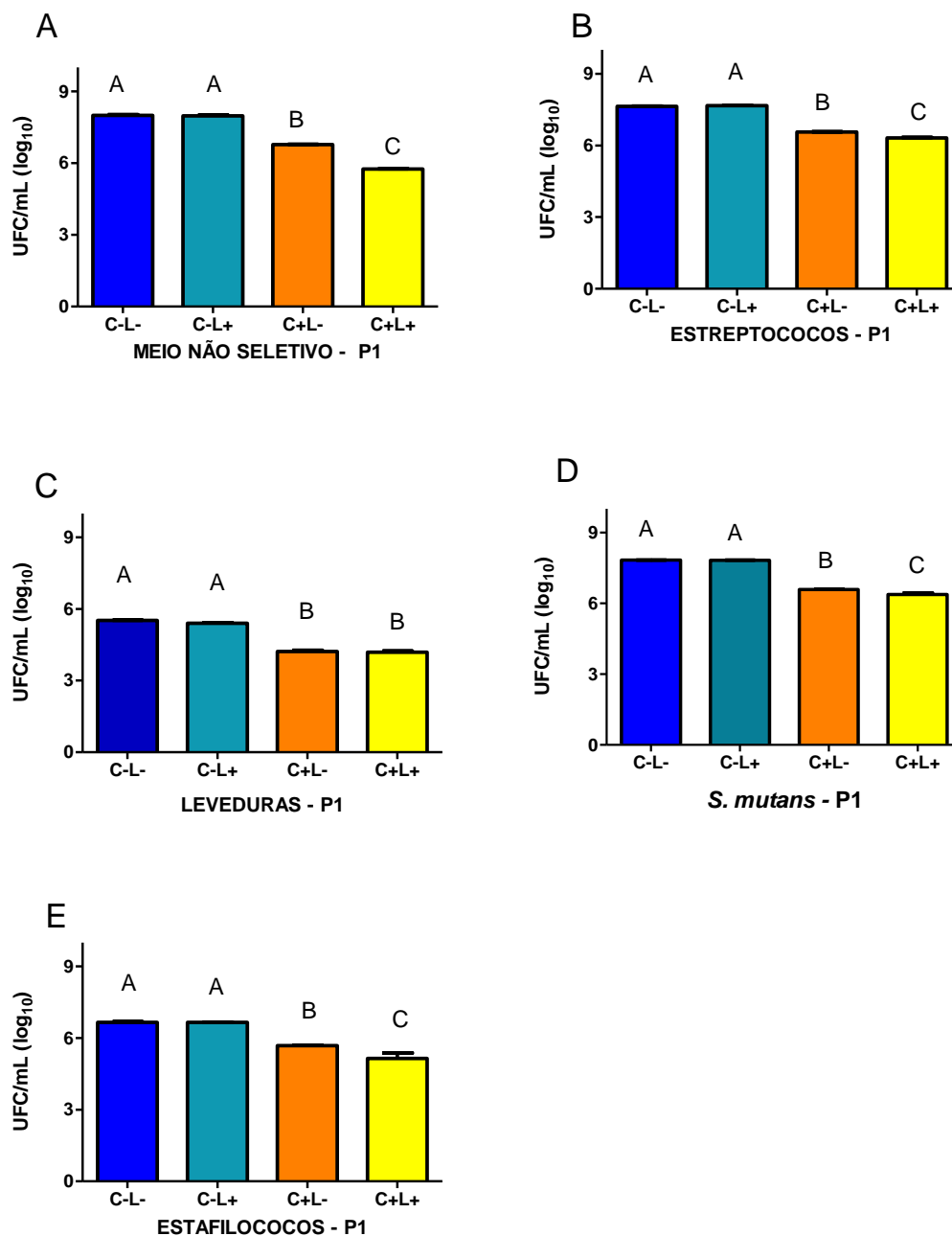
Na contagem dos estreptococos em MS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 7,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa (C+L+) apresentou uma redução de 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 12B).

Na contagem de leveduras em ASD com cloranfenicol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 5,4 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e não apresentou redução significativa quando comparado ao grupo C+L- (Figura 12C).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 7,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa (C+L+) apresentou uma redução de 1,5 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 12D).

Na contagem de estafilococos em ágar Manitol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 1,5 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,6 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 12E).

Figura 12 – Viabilidade microbiana de biofilme microcosmos da amostra P1 submetido a TFDa mediada por CUR (40 µg/mL)



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub> UFC/mL) microbiana de biofilme microcosmo da amostra P1 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 40 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Contagem A) em meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI), (B) de estreptococos (ágar Mitis Salivarius, MS), (C) de leveduras [ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol], D) de estreptococos do grupo *mutans* (ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose, MSBS), E) de estafilococos (ágar Manitol). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.5.2 Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo formado a partir da amostra clínica do paciente 2

A amostra P2 submetida a TFDa com CUR (20 µg/mL; 5x CIM) apresentou crescimento microbiano nos meios ágar BHI, Mitis Salivarius, MSBS, Manitol e Sabouraud com cloranfenicol. A contagem de microrganismos em meio não seletivo, ágar BHI, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,4 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 2,1 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e não apresentou redução na contagem dos microrganismos quando comparado ao grupo C+L- (Figura 13A).

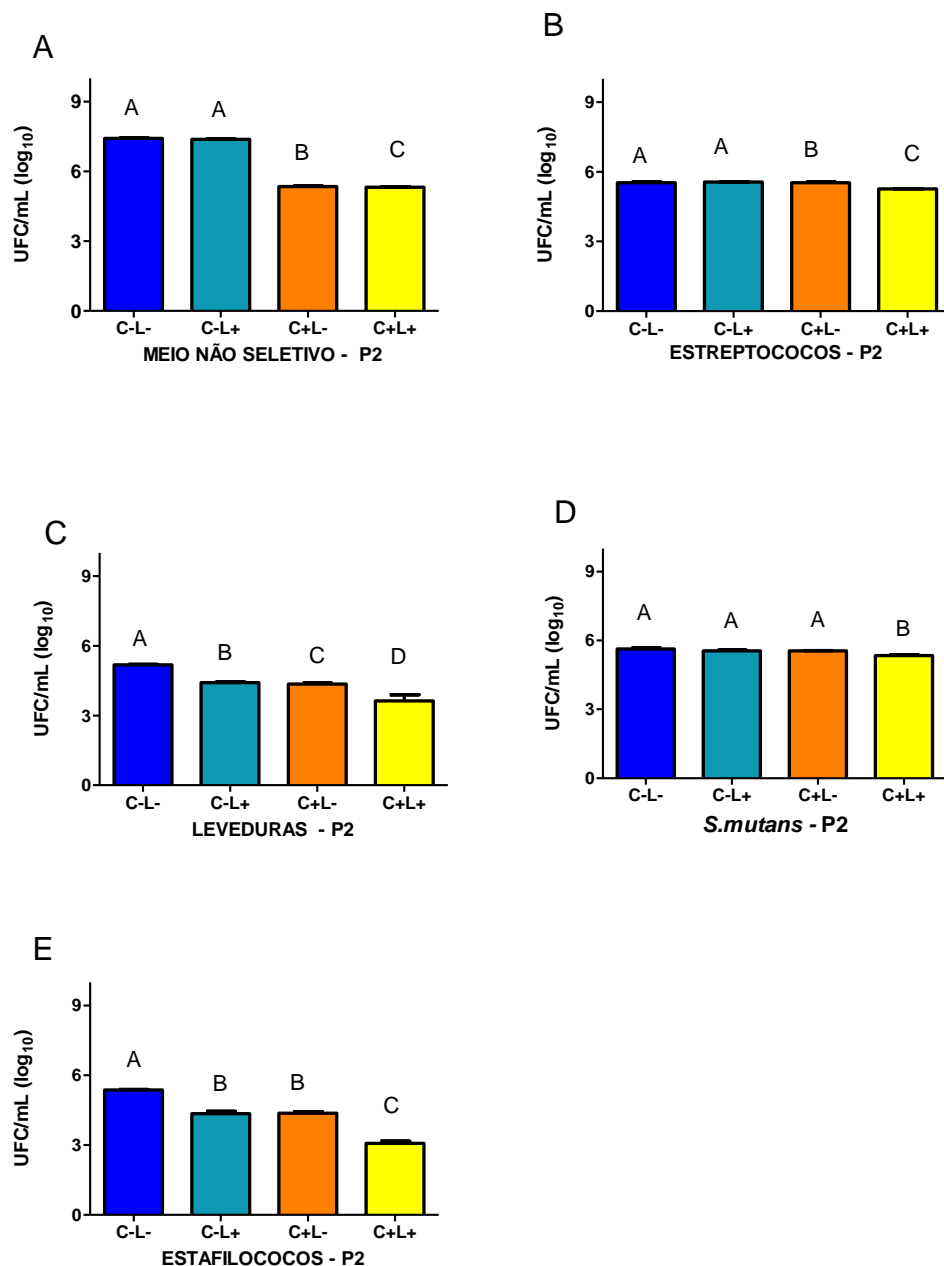
Na contagem dos estreptococos em ágar mitis salivarius, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 5,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 0,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 13B).

Na contagem de leveduras em ASD com cloranfenicol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 4,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 1,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,7 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 13C).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 5,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 13D).

Na contagem de estafilococos em ágar manitol salgado, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 4,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 1,8 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 13E).

Figura 13 – Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo da amostra P2 submetido a TFDa mediada por CUR (20 µg/mL)



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub> UFC/mL) microbiana de biofilme microcosmo da amostra 2 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 20 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Contagem A) em meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI), (B) de estreptococos (ágar Mitis Salivarius, MS), (C) de lactobacilos (ágar Rogosa), (D) de estreptococos do grupo *mutans* (ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose, MSBS), (E) de estafilococos (ágar Manitol), e (F) de leveduras [ágar Saboraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol]. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Fonte: elaborado pela autora.

A amostra P2 submetida a TFDa com CUR (40 µg/mL, 10x CIM) apresentou crescimento microbiano nos meios ágar BHI, MS, MSBS, Manitol e ASD com cloranfenicol. Na contagem de microrganismos em meio não seletivo (ágar BHI), o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,9 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa (C+L+) apresentou uma redução de 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 14A).

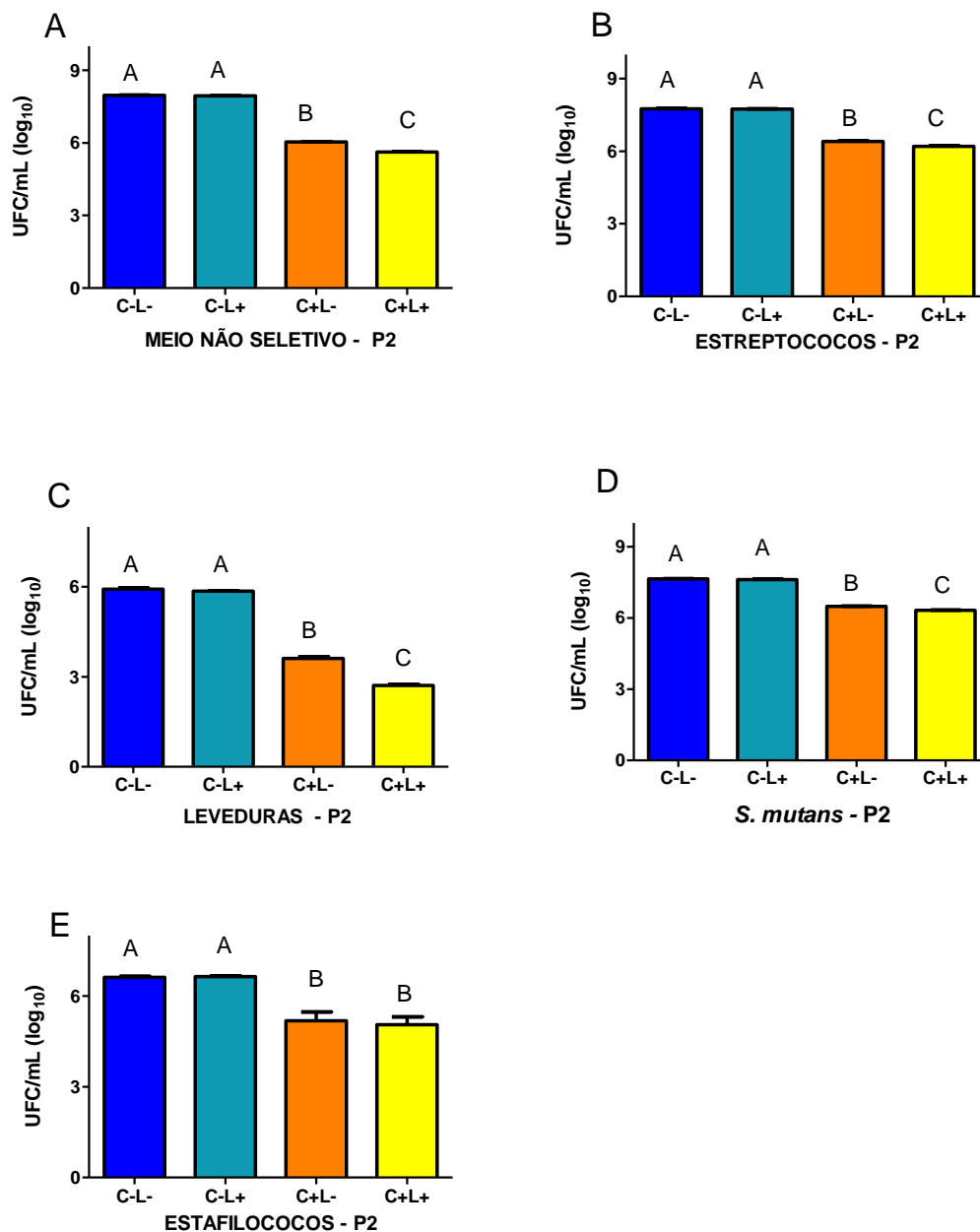
Na contagem dos estreptococos em MS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 7,7 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa (C+L+) apresentou uma redução de 1,5 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 14B).

Na contagem de leveduras em ASD com cloranfenicol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 5,8 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 3,1 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,9 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 14C).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 7,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 3,1 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,9 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 14D).

Na contagem de estafilococos em ágar Manitol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa apresentou uma redução de 1,6 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e não apresentou redução significativa quando comparado ao grupo C+L- (Figura 14E).

Figura 14 – Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo da amostra P2 submetido a TFDa mediada por CUR (40 µg/mL)



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub> UFC/mL) microbiana de biofilme microcosmo da amostra 2 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 40 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Contagem A) em meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI), (B) de estreptococos (ágar Mitis Salivarius, MS), (C) de lactobacilos (ágar Rogosa), (D) de estreptococos do grupo *mutans* (ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose, MSBS), (E) de estafilococos (ágar Manitol), e (F) de leveduras [ágar Saboraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol]. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.5.3 Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo formado a partir da amostra clínica do paciente 3

A amostra P3 submetida a TFDa com CUR (20 µg/mL, 5x CIM) apresentou crescimento microbiano nos meios ágar BHI, Mitis Salivarius, MSBS, Manitol e Sabouraud com cloranfenicol. A contagem de microrganismos em meio não seletivo ágar BHI, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,4 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 3,0 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,0 log<sub>10</sub> UFC/mL na contagem dos microrganismos quando comparado ao grupo C+L- (Figura 15A).

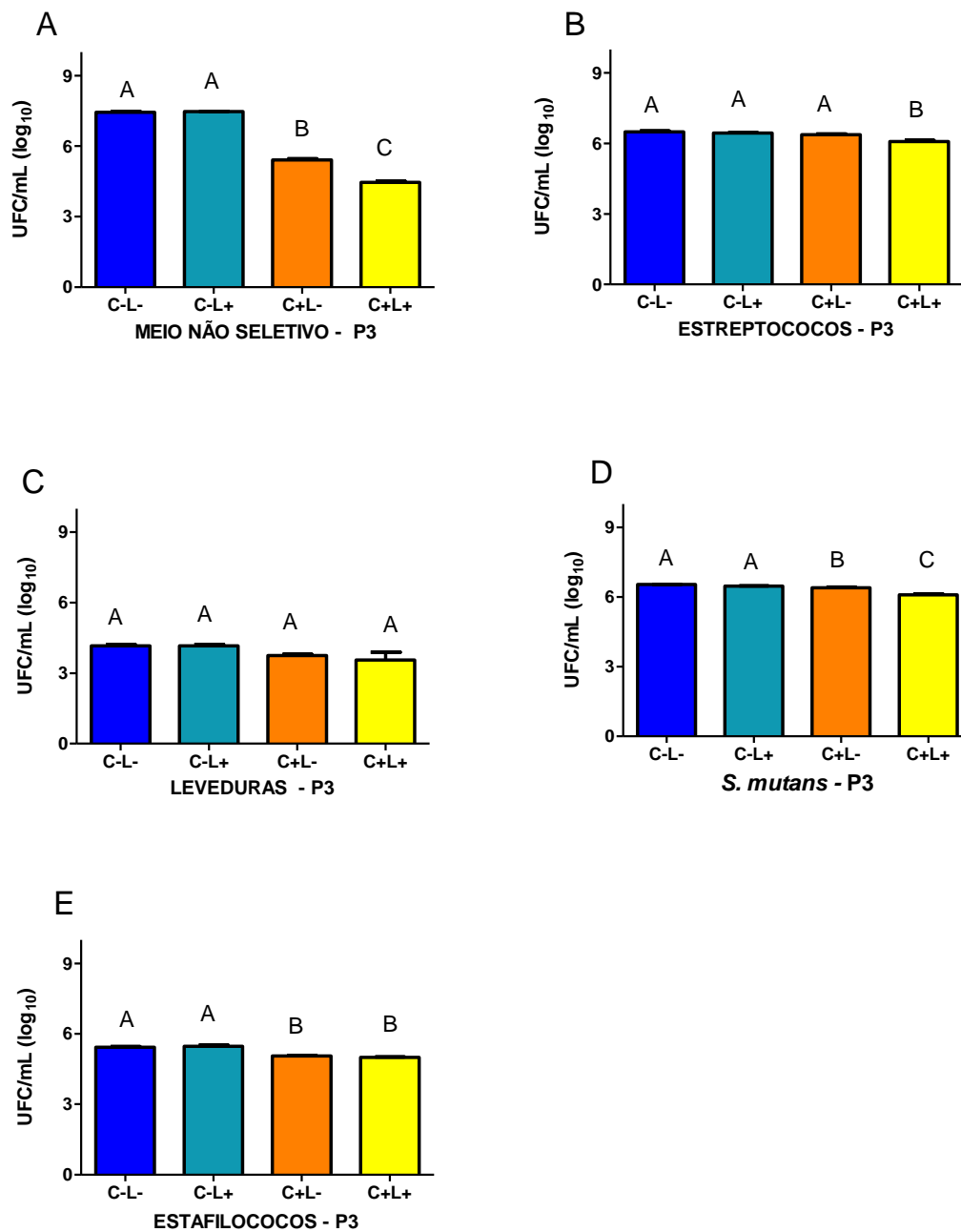
Na contagem dos estreptococos em ágar mitis salivarius, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 0,5 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 15B).

Na contagem de leveduras em ASD com cloranfenicol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 4,1 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 0,6 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 15C).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,4 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 0,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 15D).

Na contagem de estafilococos em ágar manitol salgado, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 5,4 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 0,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e não apresentou redução quando comparado ao grupo C+L- (Figura 15E).

Figura 15 - Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo da amostra P3 submetido a TFDa mediada por CUR (20 µg/mL)



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub> UFC/mL) microbiana de biofilme microcosmo da amostra 3 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 20 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Contagem A) em meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI), (B) de estreptococos (ágar Mitis Salivarius, MS), (C) de lactobacilos (ágar Rogosa), (D) de estreptococos do grupo *mutans* (ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose, MSBS), (E) de estafilococos (ágar Manitol), e (F) de leveduras [ágar Saboraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol]. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pela autora.

A amostra P3 submetida a TFDa com CUR (40 µg/mL, 10x CIM) apresentou crescimento microbiano nos meios ágar BHI, Mitis Salivarius, MSBS, Manitol, Sabouraud com cloranfenicol e Rogosa. A contagem de microrganismos em meio não seletivo ágar BHI, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média 7,9 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 2,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,2 log<sub>10</sub> UFC/mL na contagem dos microrganismos quando comparado ao grupo C+L- (Figura 16A).

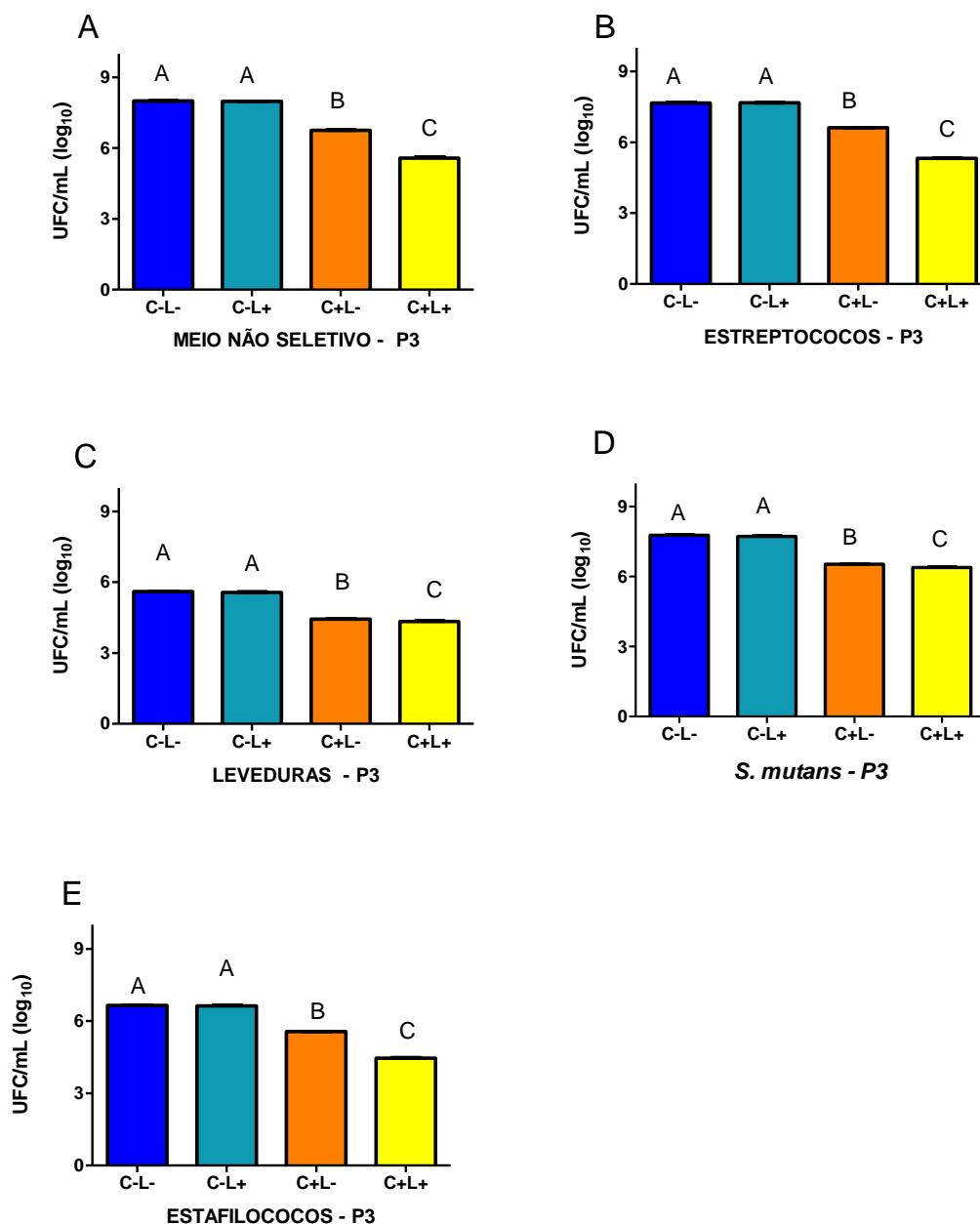
Na contagem dos estreptococos em ágar mitis salivarius, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 7,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 2,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 1,3 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 16B).

Na contagem de leveduras em ASD com cloranfenicol, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 5,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 1,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,1 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 16C).

Na contagem de estreptococos do grupo *mutans* em ágar MSBS, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 7,7 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 1,4 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e uma redução de 0,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 16D).

Na contagem de estafilococos em ágar manitol salgado, o crescimento nos grupos controle (C-L- e C-L+) foi em média de 6,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. O grupo tratado com TFDa, apresentou uma redução de 2,2 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado a média dos grupos controle e e uma redução de 1,1 log<sub>10</sub> UFC/mL quando comparado ao grupo C+L- (Figura 16E).

Figura 16 - Viabilidade microbiana de biofilme microcosmo da amostra P3 submetido a TFDA mediada por CUR (40 µg/mL)



Legenda: Viabilidade (log<sub>10</sub> UFC/mL) microbiana de biofilme microcosmo da amostra 3 não expostas (C-) e expostas a curcumina (CUR; C+) na concentração de 40 µg/mL na ausência (L-) e na presença de luz (L+). Contagem A) em meio não seletivo (ágar infusão de cérebro e coração, BHI), (B) de estreptococos (ágar Mitis Salivarius, MS), C) de lactobacilos (ágar Rogosa), D) de estreptococos do grupo *mutans* (ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose, MSBS), E) de estafilococos (ágar Manitol), e F) de leveduras [ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol]. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Fonte: elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Primeira etapa

A CUR é um composto polifenólico com ampla atividade antimicrobiana (Hewlings et al., 2017, Santezi et al., 2021), cuja ação pode ser potencializada por meio do seu uso como fotossensibilizador na TFDa (Meccatti et al., 2022, Sakima et al., 2018). Embora a CUR apresente boa atividade antimicrobiana, sua hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade são fatores limitantes para a aplicação clínica. No intuito de superar estas limitações, nanopartículas (NpFeCUR, NpFePEI e NpFeCUR+) foram sintetizadas e avaliadas como fotossensibilizadores para TFDa, visando o tratamento de células e biofilmes de *C. albicans*.

Estudos têm demonstrado os efeitos das nanopartículas de ferro puras e associadas a antifúngicos contra *Candida* spp. (Seddighi et al., 2017, Arias et al., 2020, Caldeirão et al., 2021). Entretanto, o uso dessas nanopartículas para carreamento de fotossensibilizadores, como a CUR, é recente e pouco estudado.

Inicialmente, a TFDa utilizando NpFeCUR como fotossensibilizador não exibiu atividade contra *C. albicans*. Além disso, NpFeCUR não foi capaz de inibir o crescimento fúngico mesmo na ausência de luz. Lima et al. (2020) demonstraram a ação antifúngica de nanopartículas de ferro contra *Candida* spp. a 1250 µg/mL. No presente estudo, a maior concentração testada foi 290 µg/mL, visto que essa foi a concentração máxima obtida a partir do método de síntese empregado. Além disso, o método de síntese utilizado foi diferente, o que pode ter influenciado na atividade das nanopartículas.

Análises de potencial Zeta revelaram a carga negativa de NpFeCUR após a síntese. Esse pode ser outro fator que influenciou a atividade das nanopartículas, já que a membrana plasmática de *C. albicans* também tem carga negativa (Russell et al., 2022). Portanto, a adição de PEI ao método de síntese teve como objetivo tornar a carga das NpFeCUR positiva, viabilizando maior ação antimicrobiana. Rezvani et al. (2013) demonstraram que cargas altamente positivas na superfície acarretam interações eletrostáticas com a membrana plasmática, resultando em danos a essa

estrutura. Entretanto, mesmo após adição de PEI, as NpFePEI não exibiram ação contra *C. albicans* na ausência e na presença de luz (TFDa).

Desse modo, uma nova estratégia de síntese foi utilizada. A perspectiva de obtenção de nanopartículas de ouro enriquecidas com CUR se baseou no trabalho desenvolvido por De Santana et al. (2020). Após a síntese por coprecipitação de ferrofluido alcalino, os autores enriqueceram suas nanopartículas mantendo a dispersão coloidal em uma solução com altas concentrações de CUR. Por fim, eles utilizaram as nanopartículas como fotossensibilizadores e observaram ação contra *S. aureus* em concentrações variando de 40 a 4000 µg/mL, a depender dos parâmetros de irradiação.

No nosso estudo, NpFeCUR também não exibiram atividade contra *C. albicans* tanto na ausência quanto na presença de luz. É provável que a falta de atividade de NpFeCUR, NpFePEI e NpFeCUR+ tenha sido influenciada pelas estratégias de síntese que modulam as características físico-químicas das nanopartículas e, conseqüentemente, sua atividade antifúngica. Apesar disso, novos métodos de síntese de fotossensibilizadores funcionalizados com nanopartículas de ferro podem ser desenvolvidos e testados na TFDa.

## 6.2 Segunda etapa

Dado que as nanopartículas de ferro associadas a CUR (NpFeCUR, NpFePEI e NpFeCUR+) não exibiram atividade enquanto fotossensibilizadores na TFDa contra *Candida* spp., optou-se por estudar os efeitos da TFDa mediada por CUR livre sobre amostras de biofilmes e cepas de *Candida* isoladas de estomatite protética.

Para tanto, amostras de biofilmes microcosmos de estomatite protética foram coletadas de 5 pacientes e analisadas quanto a presença de *Candida*. A presença de *Candida* foi positiva em 60% das amostras, reforçando o papel desse agente na patogênese da estomatite protética (Manikandan et al., 2022). Ao avaliar a ocorrência de *Candida* na cavidade bucal de usuários de prótese dentária, Silva et

al. (2015) encontraram uma prevalência de 77,27%, percentual próximo ao encontrado nesse estudo.

Entre as amostras positivas para *Candida*, duas foram identificadas como *C. dubliniensis*, enquanto uma foi identificada como *C. albicans*. Esses resultados vão de encontro ao que tem se observado na literatura. Diversos estudos têm demonstrado a presença majoritária de *C. albicans* em amostras de estomatite protética. Entretanto, espécies como *N. glabratus*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* e *C. parapsilosis* também têm sido isoladas, mas em menor prevalência quando comparado a *C. albicans* (Gauch et al., 2017, Manikandan et al., 2022, Qiu et al., 2023). No presente estudo, *C. dubliniensis* foi a espécie mais prevalente, corroborando estudos anteriores em que esse agente foi isolado a partir de amostras de estomatite protética (Marcos-Arias et al., 2009; Qiu et al., 2023).

A partir da obtenção das amostras de biofilmes microcosmos e do isolamento e identificação das cepas de *Candida* nessas amostras, os efeitos da TFDa mediada por CUR livre foi avaliada. A curcumina destaca-se por ser um produto natural, de baixo custo e com ação antimicrobiana contra diferentes microrganismos potencialmente patogênicos. A curcumina possui comportamento de fotossensibilizador devido à sua capacidade de absorver luz no espectro azul e resultar no aumento da produção de ERO, moléculas com efeitos antimicrobianos (Abdulrahman et al., 2020, Songca et al., 2022).

Estudos anteriores demonstraram que a TFDa mediada por CUR resulta em aumento da produção de radicais superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio singleto, coletivamente denominados ERO. Esse aumento pode comprometer a integridade celular devido aos danos causados em diversas macromoléculas e a potencial peroxidação lipídica dos componentes da membrana plasmática fúngica (Chen et al., 2022, Dias et al., 2023). Além disso, a TFDa mediada por CUR foi capaz de reduzir a expressão de genes relacionados a adesão, formação de biofilme e atividade antioxidante de *C. albicans* (Jordão et al., 2020).

Nesse estudo, a irradiação de CUR na luz azul acarretou atividade fungicida e redução dos valores de CIM em 16 vezes quando comparado a CUR não irradiada. Além disso, a TFDa mediada por CUR livre foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de células de *C. albicans* e *C. dubliniensis* após 2 horas de tratamento. As 24 horas de tratamento, observou-se considerável aumento

no crescimento das cepas de *Candida* submetidas a TFDa com CUR, confirmando que, conforme evidenciado Casu et al. (2022), o uso de CUR na TFDa apresenta efeito fungistático contra *Candida*.

A TFDa mediada por CUR também exibiu efeitos contra biofilmes monoespécie de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em valores de 1x CIM. Entretanto, a atividade antifúngica foi potencializada com o aumento da concentração de CUR usada na TFDa. Tais resultados corroboram o observado por Sanitá et al. (2018) e Santos et al. (2022). Em seus estudos, os autores notaram reduções significativas no biofilme monoespécie de *C. dubliniensis* e *C. albicans* após TFDa mediada por CUR. Assim como observado para as células planctônicas, é possível que o aumento da produção de ERO esteja associado a atividade fungicida da TFDa mediada por CUR (Dias et al., 2023), o que reitera seu potencial uso no controle de células planctônicas e biofilmes de *C. dubliniensis* e *C. albicans*.

Assim, prosseguiu-se com a avaliação dos efeitos da TFDa mediada por CUR sobre os biofilmes microcosmos coletados. Os biofilmes microcosmos têm se demonstrado modelos adequados para representar a biodiversidade do biofilme, visto que eles elucidam, por meio de uma abordagem *in vitro*, as interações microbianas em determinado sítio (Cusicanqui et al., 2018; Araújo et al., 2022; Lebeaux et al., 2013).

A TFDa mediada por CUR exibiu efeitos contra biofilmes microcosmos a 5x CIM, mas essa ação foi potencializada a 10x CIM. Nessa concentração, foi possível observar a redução na viabilidade de leveduras, como *Candida*, mas também de estreptococos e estafilococos.

Os estreptococos são os principais colonizadores de superfícies orais e constituem 70% das bactérias cultiváveis existentes no biofilme dental. *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva, que fermenta carboidratos provenientes da dieta. São microrganismos acidogênicos, produzem polissacarídeos extracelulares, sobrevivem em meio ácido, têm capacidade de adesão às estruturas dentárias e são conhecidos como o principal causador de cáries dentárias de fissuras e superfícies lisas (Manoil et al., 2014, Terra-Garcia et al., 2019).

Os estafilococos são constituintes da microbiota oral e o principal agente patogênico do gênero, *Staphylococcus aureus*, é comumente encontrado na cavidade oral de adultos saudáveis (Campos et al., 2023, Ohara-Nemoto et al.,

2008) e usuários de prótese dentária. Além disso, infecções orais como queilite angular e mucosite estafilocócica (Gibson, Wray, Bagg, 2000) também podem estar associadas aos estafilococos. Portanto, é importante que a TFDa atue não somente sobre as leveduras, mas também os estreptococos e estafilococos, agentes importantes de infecções da cavidade oral.

No nosso estudo, a TFDa mediada por CUR foi capaz de reduzir essas populações, reforçando seus efeitos contra os microrganismos com potencial patogênico. Assim como observado para os biofilmes monoespécie, as ERO têm capacidade de reduzir a viabilidade microbiana em biofilmes microcosmos e, paralelamente, degradar a estrutura da matriz exopolimérica, o que torna a TFDa uma abordagem adequada e promissora para o tratamento dos biofilmes (Hu et al., 2018).

Apesar de haverem muitos estudos sobre a TFDa mediada por CUR contra *Candida*, existem poucos trabalhos que avaliam seus efeitos sobre biofilmes microcosmos. Além disso, não foi encontrado, até o momento, estudos que usaram a CUR na TFDa para tratamento de biofilmes microcosmos de estomatite protética, ressaltando o aspecto inovar do presente trabalho.

Em conjunto, os resultados sugerem que os parâmetros utilizados para a TFDa contra células planctônicas, biofilmes monoespécies e microcosmos resultaram em danos importantes aos microrganismos, provavelmente em decorrência do aumento da produção de ERO. A disrupção da membrana citoplasmática em decorrência do aumento de ERO auxilia na internalização da curcumina, o que potencializa sua ação antimicrobiana (Chen et al., 2022, Dias et al., 2023).

Em contrapartida, embora CUR tenha exibido resultados promissores contra células planctônicas, biofilmes monoespécie e microcosmos no presente estudo, é necessário analisar essa atividade em um maior número de amostras para determinar seu potencial para futura utilização e indicação na prática clínica.

## 7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- A TFDa mediada por NpFeCUR não foi eficaz contra células planctônicas e biofilmes monoespécie de *Candida albicans*. Estudos adicionais, com novas técnicas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro ainda são requeridos para avaliar seu potencial como sistema de entrega de fotossensibilizadores.
- A TFDa mediada por CUR foi eficaz contra cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* isoladas de pacientes com estomatite protética, tendo efeitos antimicrobianos tanto em culturas planctônicas, como biofilmes monoespécies e microcosmos. Portanto, a CUR representa um fotossensibilizador promissor para TFDa direcionada ao tratamento de estomatite protética.

## REFERÊNCIAS

- Abdallah BM, Ali EM. Therapeutic Effect of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Erodium glaucophyllum* Extract against Oral Candidiasis: In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*. 2022 Jun 30;27(13):4221. doi: 10.3390/molecules27134221. PMID: 35807474; PMCID: PMC9267989.
- Abdolrasouli A, Fraser MA. Candida auris Identification and Profiling by MALDI-ToF Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2022; 2517:21-32. doi: 10.1007/978-1-0716-2417-3\_2.
- Abuhajar E, Ali K, Zulfiqar G, Al Ansari K, Raja HZ, Bishti S, Anweigi L. Management of Chronic Atrophic Candidiasis (Denture Stomatitis)-A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Feb 9;20(4):3029. doi: 10.3390/ijerph20043029. PMID: 36833718; PMCID: PMC9967389.
- Abdulrahman H, Misba L, Ahmad S, Khan AU. Curcumin induced photodynamic therapy mediated suppression of quorum sensing pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: An approach to inhibit biofilm in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Jun;30:101645. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101645. Epub 2019 Dec 31. PMID: 31899376.
- Adam RZ, Kimmie-Dhansay F. Prevalence of Denture-Related Stomatitis in Edentulous Patients at a Tertiary Dental Teaching Hospital. *Front Oral Health*. 2021 Dec 1;2:772679. doi: 10.3389/froh.2021.772679. PMID: 35048072; PMCID: PMC8757833.
- Alves F, Carmello JC, Alonso GC, Mima EGO, Bagnato VS, Pavarina AC. A randomized clinical trial evaluating Photodithazine-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy as a treatment for Denture stomatitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Dec;32:102041. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102041. Epub 2020 Oct 3. PMID: 33022417.
- Araújo HC, Ramírez Carmona W, Sato C, Dos Santos Oliveira M, Alves GDSG, Morato DN, Pessan JP, Monteiro DR. In vitro antimicrobial effects of chitosan on microcosm biofilms of oral candidiasis. *J Dent*. 2022 Oct;125:104246. doi: 10.1016/j.jdent.2022.104246.
- Arias LS, Pessan JP, de Souza Neto FN, Lima BHR, de Camargo ER, Ramage G, Delbem ACB, Monteiro DR. Novel nanocarrier of miconazole based on chitosan-coated iron oxide nanoparticles as a nanotherapy to fight *Candida* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020 Apr 25;192:111080. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111080.
- Arnaud, R. R., Soares, M. S. M., dos Santos, M. G. C., & dos Santos, R. C. (2012). ESTOMATITE PROTÉTICA: PREVALÊNCIA E CORRELAÇÃO COM IDADE E GÊNERO. *Revista Brasileira De Ciências Da Saúde*, 16(1), 59–62. <https://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/rbcs/article/view/10594>

Arruda C, Artico G, Freitas R, Filho A, Migliari D. Prevalence of *Candida* spp. in Healthy Oral Mucosa Surfaces with Higher Incidence of Chronic Hyperplastic Candidosis. *J Contemp Dent Pract*. 2016 Aug 1;17(8):618-22. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1900.

Balhaddad AA, Garcia IM, Ibrahim MS, Rolim JPML, Gomes EAB, Martinho FC, Collares FM, Xu H, Melo MAS. Prospects on Nano-Based Platforms for Antimicrobial Photodynamic Therapy Against Oral Biofilms. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2020 Aug;38(8):481-496. doi: 10.1089/photob.2020.4815.

Baran I, Nalçacı R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. *Arch Gerontol Geriatr*. 2009 Sep-Oct;49(2):237-241. doi: 10.1016/j.archger.2008.08.010. Epub 2008 Oct 30. PMID: 18976822.

Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1999; 13(4):343-8.

Bekmukhametova A, Ruprai H, Hook JM, Mawad D, Houang J, Lauto A. Photodynamic therapy with nanoparticles to combat microbial infection and resistance. *Nanoscale*. 2020 Oct 29;12(41):21034-21059. doi: 10.1039/d0nr04540c. PMID: 33078823.

Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:246012. doi: 10.1155/2015/246012.

Borman AM, Johnson EM. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019. *J Clin Microbiol*. 2021 Jan 21;59(2):e01811-20. doi: 10.1128/JCM.01811-20.

Bradford LL, Ravel J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*. 2017 Apr 3;8(3):342-351. doi: 10.1080/21505594.2016.1237332.

Caldeirão, ACM; Araújo, HC; Tomasela, CM; Sampaio, C.; dos Santos Oliveira, MJ; Ramagem, G.; Pessan, JP; Monteiro, DR Efeitos de Carreadores Antifúngicos Baseados em Nanopartículas de Óxido de Ferro Revestidas com Quitosana em Biofilmes de Microcosmos. *Antibióticos* 2021, 10, 588. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050588>

Campos J, Pires MF, Sousa M, Campos C, da Costa CFFA, Sampaio-Maia B. Unveiling the Relevance of the Oral Cavity as a *Staphylococcus aureus* Colonization Site and Potential Source of Antimicrobial Resistance. *Pathogens*. 2023 May 26;12(6):765. doi: 10.3390/pathogens12060765. PMID: 37375455; PMCID: PMC10304336.

- Carmo PHFD, Garcia MT, Figueiredo-Godoi LMA, Lage ACP, Silva NSD, Junqueira JC. Metal Nanoparticles to Combat *Candida albicans* Infections: An Update. *Microorganisms*. 2023 Jan 5;11(1):138. doi: 10.3390/microorganisms11010138.
- Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Dec;11(12):884-91. doi: 10.1038/nrmicro3156.
- Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*. 2015 May;122(6):785-794. doi: 10.1111/1471-0528.12994. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25052208.
- Casu C, Orrù G, Scano A. Curcumin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photodynamically activated: an antimicrobial time-response assessment against an MDR strain of *Candida albicans*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 Dec;26(23):8841-8851. doi: 10.26355/eurev\_202212\_30556. PMID: 36524503.
- Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Res Microbiol*. 2017 Nov-Dec;168(9-10):802-810. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.005. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28263903
- Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Feb 13;5:28. doi: 10.3389/fmed.2018.00028.
- Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020 Dec;11(1):337-348. doi: 10.1080/21505594.2020.1748930.
- Chen T, Yang D, Lei S, Liu J, Song Y, Zhao H, Zeng X, Dan H, Chen Q. Photodynamic therapy-a promising treatment of oral mucosal infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Sep;39:103010. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103010.
- Contaldo M, Romano A, Mascitti M, Fiori F, Della Vella F, Serpico R, Santarelli A. Association between denture stomatitis, candida species and diabetic status. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019 May-Jun;33(3 Suppl. 1):35-41. DENTAL SUPPLEMENT. PMID: 31538448.
- Contaldo M, Di Stasio D, Romano A, Fiori F, Della Vella F, Rupe C, Lajolo C, Petruzzi M, Serpico R, Lucchese A. Oral Candidiasis and Novel Therapeutic Strategies: Antifungals, Phytotherapy, Probiotics, and Photodynamic Therapy. *Curr Drug Deliv*. 2023;20(5):441-456. doi: 10.2174/1567201819666220418104042
- Coronado-Castellote L, Jiménez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*. 2013 Dec 1;5(5):e279-86. doi: 10.4317/jced.51242.
- Cusicanqui Méndez DA, Gutierrez E, José Dionisio E, Afonso Rabelo Buzalaf M, Cardoso Oliveira R, Andrade Moreira Machado MA, Cruvinel T. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Dec;24:102-108. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.007. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30240927.

Da Fonseca AS, Mencialha AL, de Paoli F. Antimicrobial photodynamic therapy against *Acinetobacter baumannii*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Sep;35:102430. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102430.

Dakka A, Nazir Z, Shamim H, Jean M, Umair M, Muddaloor P, Farinango M, Ansary A, Khan S. III Effects and Complications Associated to Removable Dentures With Improper Use and Poor Oral Hygiene: A Systematic Review. *Cureus*. 2022 Aug 18;14(8):e28144. doi: 10.7759/cureus.28144. PMID: 36148203; PMCID: PMC9482451.

De Carvalho L, Carvalho ML, da Silva BM, Zamuner S, Alberto-Silva C, Costa MS. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using Methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019;26:316-323. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.04.026.

De Barros PP, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JC, Junqueira JC. *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. *Mycopathologia*. 2020 Jun;185(3):415-424. doi: 10.1007/s11046-020-00445-w.

De Lapena SAB, Terra-Garcia M, Ward RADC, Rossoni RD, Melo VMM, Junqueira JC. Enhancing effect of chitosan on methylene blue-mediated photodynamic therapy against *C. albicans*: A study in planktonic growth, biofilms, and persister cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022 Jun;38:102837. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102837. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35367386.

De Lima TM, Arias LS, Afanaci LF, Ferraresse RF, de S Neto FN, de Lima BH, Straioto FG, de Camargo ER, Pessan JP, Monteiro DR. Assembly and antifungal effect of a new fluconazole-carrier nanosystem. *Future Microbiol*. 2020 Mar;15:273-285. doi: 10.2217/fmb-2019-0182.

De Santana WMOS, Caetano BL, de Annunzio SR, Pulcinelli SH, Ménager C, Fontana CR, Santilli CV. Conjugation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and curcumin photosensitizer to assist in photodynamic therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020 Dec;196:111297. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111297.

Dias LM, Klein MI, Ferrisse TM, Medeiros KS, Jordão CC, Bellini A, Pavarina AC. The Effect of Sub-Lethal Successive Applications of Photodynamic Therapy on *Candida albicans* Biofilm Depends on the Photosensitizer. *J Fungi (Basel)*. 2023 Jan 13;9(1):111. doi: 10.3390/jof9010111. PMID: 36675932; PMCID: PMC9861309.

El-Baz AM, Mosbah RA, Goda RM, Mansour B, Sultana T, Dahms TES, El-Ganiny AM. Back to Nature: Combating *Candida albicans* Biofilm, Phospholipase and Hemolysin Using Plant Essential Oils. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Jan 15;10(1):81. doi: 10.3390/antibiotics10010081.

El-Sakhawy MA, M Donia AER, Kobisi ANA, Abdelbasset WK, Saleh AM, Ibrahim AM, Negm RM. Oral Candidiasis of Tobacco Smokers: A Literature Review. *Pak J Biol Sci*. 2023 Jan;26(1):1-14. doi: 10.3923/pjbs.2023.1.14.

Ferrisse TM, Dias LM, de Oliveira AB, Jordão CC, Mima EGO, Pavarina AC. Efficacy of curcumin-mediated antibacterial photodynamic therapy for oral antisepsis: A systematic review and network meta-analysis of randomized clinical trials. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022 Sep;39:102876. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102876.

Gad MM, Fouda SM. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dent Med Probl.* 2020 Jan-Mar;57(1):95-102. doi: 10.17219/dmp/112861. PMID: 32307934.

Galvan R, McBride M, Korioto TV, Garcia-Godoy F. Denture Hygiene as It Relates to Denture Stomatitis: A Review. *Compend Contin Educ Dent.* 2021 Apr;42(4):e1-e4. PMID: 34469177.

Garcia MT, Ward RADC, Gonçalves NMF, Pedrosa LLC, Neto JVDS, Strixino JF, Junqueira JC. Susceptibility of Dental Caries Microcosm Biofilms to Photodynamic Therapy Mediated by Fotoentice. *Pharmaceutics.* 2021 Nov 10;13(11):1907. doi: 10.3390/pharmaceutics13111907. PMID: 34834321.

Gauch LMR, Pedrosa SS, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Marques-da-Silva SH. Isolation of *Candida* spp. from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2018 Jan-Mar;49(1):148-151. doi: 10.1016/j.bjm.2017.07.001. Epub 2017 Jul 29. PMID: 29054393; PMCID: PMC5790581.

Ghasemi M, Khorsandi K, Kianmehr Z. Photodynamic inactivation with curcumin and silver nanoparticles hinders *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm formation: evaluation of glutathione peroxidase activity and ROS production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021 Aug 11;37(9):149. doi: 10.1007/s11274-021-03104-4.

Gholami A, Mohammadi F, Ghasemi Y, Omidifar N, Ebrahiminezhad A. Antibacterial activity of SPIONs versus ferrous and ferric ions under aerobic and anaerobic conditions: a preliminary mechanism study. *IET Nanobiotechnol.* 2020 Apr;14(2):155-160. doi: 10.1049/iet-nbt.2019.0266. PMID: 32433033; PMCID: PMC8676445.

Gibson J, Wray D, Bagg J. Oral staphylococcal mucositis: A new clinical entity in orofacial granulomatosis and Crohn's disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Feb;89(2):171-6. doi: 10.1067/moe.2000.101810. PMID: 10673652.

Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J.* 2017 Dec 1;6(4):46-51. doi:10.1308/205016817822230175.

Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019 Mar;13(1):25-32. doi: 10.1007/s12105-019-01004-6.

Hemeg HA. Combatting persisted and biofilm antimicrobial resistant bacterial by

using nanoparticles. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2022 Mar 1;77(9-10):365-378. doi: 10.1515/znc-2021-0296.

Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods.* 2017 Oct 22;6(10):92. doi: 10.3390/foods6100092.

Hotta J, Garlet GP, Cestari TM, Lima JFM, Porto VC, Urban VM, Neppelenbroek KH. In vivo biocompatibility of an interim denture resilient liner containing antifungal drugs. *J Prosthet Dent.* 2019 Jan;121(1):135-142. doi: 10.1016/j.prosdent.2018.02.005.

Hu L, He C, Zhao C, Chen X, Hua H, Yan Z. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. *Microb Pathog.* 2019 Sep;134:103575. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103575.

Huang, Y.; Hsu, J.C.; Koo, H.; Cormode, D.P. Repurposing Ferumoxytol: Diagnostic and Therapeutic Applications of an FDA-Approved Nanoparticle. *Theranostics* 2022, 12, 796–816.

Imran M, Chaudhary AA, Ahmed S, Alam MM, Khan A, Zouli N, Hakami J, Rudayni HA, Khan SU. Iron Oxide Nanoparticle-Based Ferro-Nanofluids for Advanced Technological Applications. *Molecules.* 2022 Nov 16;27(22):7931. doi: 10.3390/molecules27227931.

Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL Jr, Noverr M. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infect Immun.* 2016 Sep 19;84(10):2724-39. doi: 10.1128/IAI.00469-16.

Javed F, Samaranayake LP, Romanos GE. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sci.* 2014 May;13(5):726-34. doi: 10.1039/c3pp50426c. PMID: 24686309.

Jordão CC, Viana de Sousa T, Inês Klein M, Mendonça Dias L, Pavarina AC, Carmello JC. Antimicrobial photodynamic therapy reduces gene expression of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Sep;31:101825. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101825. Epub 2020 May 21. PMID: 32445962.

Kanpittaya K, Teerakapong A, Morales NP, Hormdee D, Priprem A, Weera-Archakul W, Damrongrungruang T. Inhibitory Effects of Erythrosine/Curcumin Derivatives/Nano-Titanium Dioxide-Mediated Photodynamic Therapy on *Candida albicans*. *Molecules.* 2021 Apr 21;26(9):2405. doi: 10.3390/molecules26092405

Karajacob AS, Azizan NB, Al-Maleki ARM, Goh JPE, Loke MF, Khor HM, Ho GF, Ponnampalavanar S, Tay ST. *Candida* species and oral mycobiota of patients clinically diagnosed with oral thrush. *PLoS One.* 2023 Apr 17;18(4):e0284043. doi: 10.1371/journal.pone.0284043.

Kareem HA, Samaka HM, Abdulridha WM. Evaluation of the effect of the gold nanoparticles prepared by green chemistry on the treatment of cutaneous candidiasis. *Curr Med Mycol*. 2021 Mar;7(1):1-5. doi: 10.18502/cmm.7.1.6176. PMID: 34553090; PMCID: PMC8443874.

Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2023 Feb;71:102237. doi: 10.1016/j.mib.2022.102237. Epub 2022 Nov 24. PMID: 36436326.

Khatoon N, Sharma Y, Sardar M, Manzoor N. Mode of action and anti-*Candida* activity of *Artemisia annua* mediated-synthesized silver nanoparticles. *J Mycol Med*. 2019 Sep;29(3):201-209. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.07.005. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31378442.

Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses*. 2006 Jul;49(4):283-7. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01237.x. PMID: 16784441.

Kulshrestha A, Gupta P. Secreted aspartyl proteases family: a perspective review on the regulation of fungal pathogenesis. *Future Microbiol*. 2023 Mar;18:295-309. doi: 10.2217/fmb-2022-0143

Laubach V, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger S, Zöller N. Extrinsic or Intrinsic Apoptosis by Curcumin and Light: Still a Mystery. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 19;20(4):905. doi: 10.3390/ijms20040905.

Le Bars P, Kouadio AA, Bandiaky ON, Le Guéhennec L, de La Cochetière MF. Host's Immunity and *Candida* Species Associated with Denture Stomatitis: A Narrative Review. *Microorganisms*. 2022 Jul 16;10(7):1437. doi: 10.3390/microorganisms10071437.

Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):288-356. doi: 10.3390/pathogens2020288. PMID: 25437038; PMCID: PMC4235718.

Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev*. 2021 Mar 24;121(6):3390-3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.

Leferman CE, Stoica L, Tiglis M, Stoica BA, Hancianu M, Ciubotaru AD, Salaru DL, Badescu AC, Bogdanici CM, Ciureanu IA, Ghiciuc CM. Overcoming Drug Resistance in a Clinical *C. albicans* Strain Using Photoactivated Curcumin as an Adjuvant. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Jul 25;12(8):1230. doi: 10.3390/antibiotics12081230. PMID: 37627652; PMCID: PMC10451318.

Legabão BC, Galinari CB, Santos RSD, Bruschi ML, Gremião IDF, Boechat JS, Pereira SA, Malacarne LC, Caetano W, Bonfim-Mendonça PS, Svidzinski TIE. In vitro antifungal activity of curcumin mediated by photodynamic therapy on *Sporothrix brasiliensis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2023 Sep;43:103659. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103659. Epub 2023 Jun 17. PMID: 37336466.

Lemos, M.M.C.; Miranda, J.L.; Souza, M.S.G.S. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Revista Brasileira de Patologia Oral*, v.2, n.1, p.3, jan./mar. 2003

Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J*. 2017 Nov 10;223(9):675-681. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886. PMID: 29123282

Lima TM, Arias LS, Afanaci LF, Ferraresse RF, de S Neto FN, de Lima BH, Straioto FG, de Camargo ER, Pessan JP, Monteiro DR. Assembly and antifungal effect of a new fluconazole-carrier nanosystem. *Future Microbiol*. 2020 Mar;15:273-285. doi: 10.2217/fmb-2019-0182. PMID: 32271112.

Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 2022 Dec;13(1):89-121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950. PMID: 34964702; PMCID: PMC9728475.

Lu SY. Perception of iron deficiency from oral mucosa alterations that show a high prevalence of *Candida* infection. *J Formos Med Assoc*. 2016 Aug;115(8):619-27. doi: 10.1016/j.jfma.2016.03.011. Epub 2016 Apr 28. PMID: 27133388.

Lu SY. Oral Candidosis: Pathophysiology and Best Practice for Diagnosis, Classification, and Successful Management. *J Fungi (Basel)*. 2021 Jul 13;7(7):555. doi: 10.3390/jof7070555. PMID: 34356934; PMCID: PMC8306613.

Lu, M.; Cohen, M.H.; Rieves, D.; Pazdur, R. FDA Report: Ferumoxitol for Intravenous Iron Therapy in Adult Patients with Chronic Kidney Disease. *Am. J. Hematol*. 2010, 85, 315–319.

MacFarlane TW, Helnarska SJ. The microbiology of angular cheilitis. *Br Dent J*. 1976 Jun 15;140(12):403-6. doi: 10.1038/sj.bdj.4803773. PMID: 1067101.

Mane A, Pawale C, Gaikwad S, Bembalkar S, Risbud A. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Med Mycol*. 2011 Jul;49(5):548-51. doi: 10.3109/13693786.2010.540044. Epub 2010 Nov 26. PMID: 21108576.

Manoil D, Filieri A, Gameiro C, Lange N, Schrenzel J, Wataha JC, Bouillaguet S. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Sep;11(3):372-9. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.06.003. Epub 2014 Jun 25. PMID: 24973577.

Manikandan S, Vinesh E, Selvi DT, Kannan RK, Jayakumar A, Dinakaran J.

Prevalence of *Candida* among Denture Wearers and Nondenture Wearers. *J Pharm Bioallied Sci.* 2022 Jul;14(Suppl 1):S702-S705. doi: 10.4103/jpbs.jpbs\_781\_21. Epub 2022 Jul 13. PMID: 36110628; PMCID: PMC9469301

Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, Aguirre JM, Eraso E, Quindós G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol.* 2009 Feb;54(2):127-31. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.09.005. Epub 2008 Oct 23. PMID: 18950745.

Martorano-Fernandes L, Dornelas-Figueira LM, Marcello-Machado RM, Silva RB, Magno MB, Maia LC, Del Bel Cury AA. Oral candidiasis and denture stomatitis in diabetic patients: Systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res.* 2020 Sep 21;34:e113. doi: 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0113. PMID: 32965459.

Meccatti VM, Santos LF, de Carvalho LS, Souza CB, Carvalho CAT, Marcucci MC, Abu Hasna A, de Oliveira LD. Antifungal Action of Herbal Plants' Glycolic Extracts against *Candida* Species. *Molecules.* 2023 Mar 22;28(6):2857. doi: 10.3390/molecules28062857. PMID: 36985829; PMCID: PMC10054556.

Meena M, Zehra A, Swapnil P, Harish, Marwal A, Yadav G, Sonigra P. Endophytic Nanotechnology: An Approach to Study Scope and Potential Applications. *Front Chem.* 2021 May 25;9:613343. doi: 10.3389/fchem.2021.613343.

Melo, Iangla Araújo de e Guerra, Ricardo Consigliero. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. *SALUSVITA*, Bauru, v. 33, n. 3, p. 389-414, 2014.

Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci.* 2018a;33(3):479–87. doi: 10.1007/s10103-017-2379-3. PMID: 29119417.

Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol.* 2016 Jul-Aug;34(4):487-94. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022. Epub 2016 Mar 2. PMID: 27343964.

Modrzewska B, Kurnatowski P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. *Ann Parasitol.* 2013;59(2):57-66. PMID: 24171298.

Montagner, C. J., Oliveira, A. C., Kurrle, M., Diesel, P. G., Vitalis, G. S., & Wandscher, V. F. (2018). Métodos de higienização de próteses removíveis: uma revisão narrativa. *Disciplinarum Scientia| Saúde*, 19(3), 401-414.

Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 31;22(1):385. doi: 10.3390/ijms22010385.

Naves, P. L. F., Pinto Santana, D., Leão Ribeiro, E., & Severo Menezes, A. C. (2013). Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 12(2), 229–233.

<https://doi.org/10.9771/cmbio.v12i2.6953>

Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemoto TK. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol.* 2008 Jan;57(Pt 1):95-99. doi: 10.1099/jmm.0.47561-0. PMID: 18065673.

Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, Koc AN. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis.* 2007 Sep;60(5):280-3. PMID: 17881867.

Oliveira rc, Brum sc, Oliveira rs, Goyatá fr. Aspectos clínicos relacionados à estomatite protética. *international journal of dentistry, recife*, 6 (2):51-54 abr / jun 2007.

Pinto JG, Fontana LC, de Oliveira MA, Kurachi C, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. *Lasers Med Sci.* 2016 Jul;31(5):883-90. doi: 10.1007/s10103-016-1928-5.

Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol.* 2021 Jul;131(1):11-22. doi: 10.1111/jam.14949.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 May 11;4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26.

Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol.* 2015;91:139-235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002.

Qiu J, Roza MP, Colli KG, Dalben YR, Maifrede SB, Valiatti TB, Novo VM, Cayô R, Grão-Velloso TR, Gonçalves SS. *Candida*-associated denture stomatitis: clinical, epidemiological, and microbiological features. *Braz J Microbiol.* 2023 Jun;54(2):841-848. doi: 10.1007/s42770-023-00952-0.

Rezvani Amin Z, Rahimizadeh M, Eshghi H, Dehshahri A, Ramezani M. The effect of cationic charge density change on transfection efficiency of polyethylenimine. *Iran J Basic Med Sci.* 2013 Feb;16(2):150-6. PMID: 24298383; PMCID: PMC3843858.

Ribeiro IP, Pinto JG, Souza BMN, Miñán AG, Ferreira-Strixino J. Antimicrobial photodynamic therapy with curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022 Mar;37:102729. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102729. Epub 2022 Jan 16. PMID: 35041982.

Richardson JP, Ho J, Naglik JR. *Candida*-Epithelial Interactions. *J Fungi (Basel).* 2018 Feb 8;4(1):22. doi: 10.3390/jof4010022. PMID: 29419738;

Russell CM, Schaefer KG, Dixson A, Gray ALH, Pyron RJ, Alves DS, Moore N, Conley EA, Schuck RJ, White TA, Do TD, King GM, Barrera FN. The *Candida albicans* virulence factor candidalysin polymerizes in solution to form membrane pores and damage epithelial cells. *Elife*. 2022 Sep 29;11:e75490. doi: 10.7554/eLife.75490. PMID: 36173096; PMCID: PMC9522247.

Sachivkina N, Podoprigora I, Bokov D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Vet World*. 2021 Jun;14(6):1608-1614. doi: 10.14202/vetworld.2021.1608-1614.

Sakima VT, Barbugli PA, Cerri PS, Chorilli M, Carmello JC, Pavarina AC, Mima EGO. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Curcumin-Loaded Polymeric Nanoparticles in a Murine Model of Oral Candidiasis. *Molecules*. 2018 Aug 19;23(8):2075. doi: 10.3390/molecules23082075. PMID: 30126245; PMCID: PMC6222858.

Sanitá PV, Pavarina AC, Dovigo LN, Ribeiro APD, Andrade MC, Mima EGO. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. *Lasers Med Sci*. 2018 May;33(4):709-717. doi: 10.1007/s10103-017-2382-8. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29134404.

Santezi C, Reina BD, de Annunzio SR, Calixto G, Chorilli M, Dovigo LN. Photodynamic potential of curcumin in bioadhesive formulations: Optical characteristics and antimicrobial effect against biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Sep;35:102416. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102416.

Sartawi SY, Abu-Hammad S, A Salim N, Al-Omouh S. Denture Stomatitis Revisited: A Summary of Systematic Reviews in the Past Decade and Two Case Reports of Papillary Hyperplasia of Unusual Locations. *Int J Dent*. 2021 Oct 13;2021:7338143. doi: 10.1155/2021/7338143. PMID: 34691183; PMCID: PMC8528609.

Seddighi, N.S.; Salari, S.; Izadi, A.R. Evaluation of Antifungal Effect of Iron-oxide Nanoparticles against Different *Candida* Species. *IET Nanobiotechnol*. 2017, 11, 883–888. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0025>

Schaller M, Korting HC, Borelli C, Hamm G, Hube B. *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2005 May;73(5):2758-65. doi: 10.1128/IAI.73.5.2758-2765.2005. PMID: 15845479; PMCID: PMC1087327.

Shahmoradi M, Narimani T, Najafi F, Asadi Y, Fekrazad R. Antimicrobial photodynamic therapy with dendrosomal curcumin and blue laser against *Porphyromonas gingivalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2023 Dec;44:103825. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103825. Epub 2023 Oct 4. PMID: 37797908.

Sherwani MA, Tufail S, Khan AA, Owais M. Gold Nanoparticle-Photosensitizer Conjugate Based Photodynamic Inactivation of Biofilm Producing Cells: Potential for Treatment of *C. albicans* Infection in BALB/c Mice. PLoS One. 2015 Jul 6;10(7):e0131684. doi: 10.1371/journal.pone.0131684. PMID: 26148012; PMCID: PMC4493101.

Silva NP, Borges Paluch LR, Cequeira TPS, Vila Nova MX, Costa TBA, Jacobi CCB. Prevalence of *Candida* in oral cavity of patients wearing dental prosthesis. Mundo Saúde 2015;39(3):325-32. DOI: 10.15343/0104-7809.20153903325332.

Songca SP, Adjei Y. Applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Bacterial Biofilms. Int J Mol Sci. 2022 Mar 16;23(6):3209. doi: 10.3390/ijms23063209. PMID: 35328629; PMCID: PMC8953781.

Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. J Fungi (Basel). 2021 Jan 22;7(2):79. doi: 10.3390/jof7020079.

Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B, Edgerton M. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. PLoS Pathog. 2016 Mar 30;12(3):e1005522. doi: 10.1371/journal.ppat.1005522. PMID: 27029023; PMCID: PMC4814137.

Terra-Garcia M, de Souza CM, Ferreira Gonçalves NM, Pereira AHC, de Barros PP, Borges AB, Miyakawa W, Strixino JF, Junqueira JC. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with Fotoenticine on *Streptococcus mutans* isolated from dental caries. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021 Jun;34:102303. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102303. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33887495.

Thakur, NS, Bhaumik, J., Kirar, S., & Banerjee, UC (2017). Desenvolvimento de Nanoagentes Fototeranósticos à Base de Ouro por Via Bioinspirada e Suas Aplicações em Terapia Fotodinâmica. ACS Química e Engenharia Sustentável, 5(9), 7950–7960. doi:10.1021/acssuschemeng.7b01501

Tim M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. J Photochem Photobiol B. 2015 Sep;150:2-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.05.010. Epub 2015 May 27. PMID: 26048255.

Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. J Contemp Dent Pract. 2015 Jan 1;16(1):1-6. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1626. PMID: 25876942.

Trigo-Gutierrez JK, Vega-Chacón Y, Soares AB, Mima EGO. Antimicrobial Activity of Curcumin in Nanoformulations: A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 2021 Jul 1;22(13):7130. doi: 10.3390/ijms22137130.

Urquhart CG, Pinheiro TDR, da Silva JLG, Leal DBR, Burgo TAL, Iglesias BA, Santos RCV. Antimicrobial activity of water-soluble tetra-cationic porphyrins on *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2023 Jun;42:103266. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103266. Epub 2022 Dec 29. PMID: 36587859.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020 Jan 16;6(1):15. doi: 10.3390/jof6010015. PMID: 31963180; PMCID: PMC7151112.

Wang Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*. 2015;6(4):307-8. doi: 10.1080/21505594.2014.1000752.

Warrier A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021 Mar;33:102090. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102090.

Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology*. 2005 Sep;22(3):168-76. doi: 10.1111/j.1741-2358.2005.00065.x. PMID: 16163908.

Wong J, Zou T, Lee AHC, Zhang C. The Potential Translational Applications of Nanoparticles in Endodontics. *Int J Nanomedicine*. 2021 Mar 9;16:2087-2106. doi: 10.2147/IJN.S293518.

Yao S, Hao L, Zhou R, Jin Y, Huang J, Wu C. Multispecies biofilms in fermentation: Biofilm formation, microbial interactions, and communication. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2022 Jul;21(4):3346-3375. doi: 10.1111/1541-4337.12991.

Zangirolami AC, Dias LD, Blanco KC, Vinagreiro CS, Inada NM, Arnaut LG, Pereira MM, Bagnato VS. Avoiding ventilator-associated pneumonia: Curcumin-functionalized endotracheal tube and photodynamic action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Sep 15;117(37):22967-22973. doi: 10.1073/pnas.2006759117. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32868444; PMCID: PMC7502737.

Zhang Y, Ma J, Wang D, Xu C, Sheng S, Cheng J, Bao C, Li Y, Tian H. Fe-TCPP@CS nanoparticles as photodynamic and photothermal agents for efficient antimicrobial therapy. *Biomater Sci*. 2020 Dec 7;8(23):6526-6532. doi: 10.1039/d0bm01427c. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33103167.

Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2016 Apr;22(3):185-95. doi: 10.1111/odi.12380. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26456226

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido



As informações presentes neste termo foram fornecidas por Amanda Siqueira Fraga (Aluna de mestrado em Microbiologia e Imunologia e executora do projeto) e pela Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora), para convidar a participar e estabelecer acordo formal por escrito, através do qual o indivíduo, autoriza sua participação voluntária no estudo. O voluntário receberá do pesquisador uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **Direitos dos voluntários, garantia de esclarecimento, garantia de recusa à participação e garantia de sigilo**

Todos os voluntários receberão esclarecimentos sobre todos os passos em relação a sua participação na pesquisa. Além disso, todos os voluntários têm total liberdade de não aceitar participar ou desistir de participar em qualquer fase da pesquisa, sem penalidade alguma e sem prejuízo. Os dados coletados e as informações pessoais são confidenciais, para assegurar a privacidade dos participantes. Não haverá gastos para os voluntários. Os possíveis gastos com o uso de materiais e equipamentos serão de responsabilidade do pesquisador responsável.

### **Título do projeto de pesquisa**

**Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por curcumina incorporada em nanopartículas de ferro sobre *candida albicans*: células planctônicas e biofilme microcosmo.**

### **Objetivo do estudo**

Avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre biofilme microcosmo com associação da quitosana ao azul de metileno, para tal iremos coletar amostras

de micro-organismos do palato (céu da boca) e da prótese dos pacientes, e levar essas amostras para o laboratório de pesquisa, onde iremos realizar a cultura da amostra e aplicação da terapia fotodinâmica sobre as mesmas para avaliar seus efeitos antimicrobianos.

### **Informações sobre a coleta**

As coletas das amostras serão de participantes que usam próteses total ou removível e possuem candidíase bucal associada à prótese. A pesquisadora utilizará uma mini escova de cerdas macias, conhecida como “citobrush”, que será esfregada delicadamente pelo palato (céu da boca) para absorver os micro-organismos. Além de passar a mini-escova no céu da boca, a pesquisadora irá passar uma outra mini-escova na prótese. No momento da coleta, poderá ser gerado um constrangimento para o paciente em ter que remover a prótese na frente do pesquisador, além de o mesmo poder sentir um desconforto, uma sensação de cócegas, na região em que será realizado o esfregaço com citobrush. O presente estudo não oferece nenhum benefício direto ao participante, mas com a confirmação da nossa hipótese, de que há atividade antifúngica da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) mediada por curcumina incorporada em nanopartículas de ferro sobre células planctônicas de *Candida albicans* e biofilme microcosmo obtidos de pacientes com estomatite protética, haverá a possibilidade do surgimento de novas terapias antifúngicas para o tratamento da estomatite protética, uma alteração clínica comum e com alto grau de recidivas pós tratamentos convencionais existentes.

### **Forma de acompanhamento, assistência e contato com o pesquisador**

Os voluntários poderão entrar em contato com o pesquisador responsável para esclarecer dúvidas e comunicar qualquer tipo de urgência através de telefone, endereço ou e-mail:

Pesquisador responsável: Amanda Siqueira Fraga

Tel: (12) 988049015

Email: [as.fraga@unesp.br](mailto:as.fraga@unesp.br)

Endereço: Av. Eng. Francisco José Longo, no 777 – Jd. São Dimas, São José dos Campos – SP 12245-000. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP. Departamento de Microbiologia e Imunologia.

**Consentimento formal para participação em pesquisas clínica:**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

\_\_\_\_\_, portador da cédula de identidade \_\_\_\_\_, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica). Por fim, como pesquisadora responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 e IV.4 da resolução do CNS/MS n. 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias. A primeira via ficará de posse do participante da pesquisa e a segunda ficará com a pesquisadora. Todas as vias serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término.

São José dos Campos, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisador

## ANEXO A – Comitê de ética

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE FERRO SOBRE *Candida albicans*: estudo em células planctônicas e biofilmes microcosmos

**Pesquisador:** AMANDA SIQUEIRA FRAGA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 63745522.4.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.827.755

**Apresentação do Projeto:**

A estomatite protética é uma doença oral que resulta em processo inflamatório crônico da mucosa de suporte de uma prótese dentária parcial ou total, inflamação esta que ocorre como resposta a colonização por *Candida* que se associa geralmente a traumas dessa mucosa. Ela é uma patologia considerada fator predisponente para doenças cardiovasculares, pneumonia por aspiração e mortalidade em pacientes debilitados. Apesar da estomatite protética possuir etiologia multifatorial, a infecção por *Candida*, especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico. É uma infecção fúngica de tratamento longo e com grande chance de recidiva, sendo alvo do uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFD) tratamento que tem-se mostrado um eficaz agente antimicrobiano quando associado a terapia convencional. Neste cenário, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica mediada por curcumina e nanopartículas de ferro revestidas de curcumina sob culturas planctônicas e biofilme microcosmos de *Candida albicans* formados *in vitro*. A cepa de *Candida albicans* SC5314 será utilizada nos ensaios com células planctônicas. Os fotossensibilizadores utilizados serão curcumina (CUR) e nanopartícula de ferro revestida por curcumina (NpFeCUR). A fonte de luz utilizada será o fotopolimerizador x, baseado em diodo emissor de luz (LED) e densidade de potência de 1250 mW/cm<sup>2</sup>. Inicialmente o comprimento de onda será determinado pelo escaneamento dos fotossensibilizadores através do espectrofotômetro de luz. Em seguida, a eficácia da TFD será

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9008  
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9000 E-mail: ceph.ict@unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP



Continuação do Parecer: 5.827.795

determinada nos tempos  $x$  e  $y$  de irradiação. A susceptibilidade de *C. albicans* a CUR e NpFeCUR será determinada pelo ensaio de concentração inibitória mínima (CIM). Em seguida, a atividade antifúngica da TFD sobre as células planctônicas será determinada por meio dos grupos experimentais: solução fisiológica sem luz, CUR sem luz, NpFeCUR sem luz, e CUR+NpFeCUR sem luz, solução fisiológica+ luz, CUR+ luz, NpFeCUR+ luz e CUR+ NpFeCUR + luz. A atividade antifúngica será analisada por meio da viabilidade fúngica pós-TFD através do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). Para a avaliação da ação de CUR e NpFeCUR sobre biofilme microcosmo, inicialmente um projeto será submetido ao Comitê de Ética, diante da aprovação do projeto no comitê, amostras serão coletadas por estregaço de pacientes com estomatite protética. Além da coleta na região do palato duro, serão coletadas também amostras das respectivas próteses dentárias. No total, serão, realizadas coletas de cinco usuários de próteses totais ou parciais. Os biofilmes microcosmos serão formados em corpos de prova confeccionados em resina acrílica termopolimerizável à base de polimetilmetacrilato. Previamente a formação do biofilme microcosmo, será realizada a confirmação laboratorial da presença de *Candida* spp. na amostra coletada pelo método de Gram. Então, o biofilme microcosmo será formado e, após 72 horas será irradiado seguindo os mesmos grupos da terapia fotodinâmica sobre células planctônicas. Após a irradiação, a viabilidade dos grupos experimentais: solução fisiológica sem luz, CUR sem luz, NpFeCUR sem luz, e CUR+NpFeCUR sem luz, solução fisiológica+ luz, CUR+ luz, NpFeCUR+ luz e CUR+ NpFeCUR + luz será determinada (UFC/mL). Os dados obtidos serão conduzidos a uma análise exploratória. Será considerada diferença estatisticamente significante quando o valor de  $p$  for menor que 0,05.

\*Texto extraído do pesquisador\*

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo geral**

Avallar a atividade antifúngica da curcumina incorporada as nanopartículas de ferro como fotossensibilizador da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) sobre células planctônicas de *Candida albicans* e biofilme microcosmo obtidos de pacientes com estomatite protética.

**Objetivos específicos**

- a) Avallar os efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica sobre células de *Candida albicans* em culturas planctônicas com a curcumina incorporada as nanopartículas de ferro;
- b) Avallar os efeitos antimicrobianos da Terapia Fotodinâmica sobre biofilmes microcosmos,

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 8028  
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.248-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
Telefone: (12)3847-8078 Fax: (12)3847-9000 E-mail: oeph.itd@unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP



Continuação do Parecer: 5.827.755

cultivado a partir da amostra obtida de pacientes com estomatite protética, com a curcumina incorporada as nanopartículas de ferro como fotossensibilizador.

"Texto extraído do pesquisador"

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

No momento da coleta, poderá ser gerado um constrangimento para o paciente em ter que remover a prótese na frente do pesquisador, além de o mesmo poder sentir um desconforto, uma sensação de cócegas, na região em que será realizado o esfregão com citobrush.

**Benefícios:**

O presente estudo não oferece nenhum benefício direto ao participante , mas com a confirmação da nossa hipótese , de que há atividade antifúngica da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) mediada por curcumina incorporada em nanopartículas de ferro sobre células plancitônicas de *Candida albicans* e biofilme microcosmo obtidos de pacientes com estomatite protética, haverá a possibilidade do surgimento de novas terapias antifúngicas para o tratamento da estomatite protética , uma alteração clínica comum e com alto grau de recidivas pós tratamentos convencionais existentes.

"Texto extraído do pesquisador"

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Consideramos a relevância da pesquisa, uma vez que seus resultados contribuirão para o surgimento de novos tratamentos. Destacamos a competência técnica do pesquisador que realiza um boa fundamentação teórica e procedimental no que se trata das questões técnicas do presente estudo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

"Vide campo Conclusões ou Pendências"

**Recomendações:**

"Vide campo Conclusões ou Pendências"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisadora atendeu as pendências apontadas no parecer anterior.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretária do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP,

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777 - Barretos 0008  
Bairro: Jardim São Dmas CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
Telefones: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9000 E-mail: ceph.ic@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA - CAMPUS DE  
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -  
UNESP**



Continuação do Parecer: 5.027.755

para envio de relatórios parcial/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> - Sobre o ICT - Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2020992.pdf	10/11/2022 18:50:58		Aceito
Outros	formulario_resposta_pendencia.doc	10/11/2022 18:49:05	AMANDA SIQUEIRA FRAGA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_alterado.doc	10/11/2022 18:45:38	AMANDA SIQUEIRA FRAGA	Aceito
Outros	FOLDER_ORIENTACAO.pptx	21/10/2022 11:49:05	AMANDA SIQUEIRA FRAGA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_alterado.docx	21/10/2022 11:44:43	AMANDA SIQUEIRA FRAGA	Aceito
Folha de Rosto	fr.pdf	27/09/2022 08:45:49	AMANDA SIQUEIRA FRAGA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 19 de Dezembro de 2022

Assinado por:  
Denise Nicodemo  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777 - Ramal 9028  
Bairro: Jardim São Diniz CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
Telefone: (12)3047-9078 Fax: (12)3047-9000 E-mail: [ceph.ict@unesp.br](mailto:ceph.ict@unesp.br)